

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS**

**UNIDAD DE POST-GRADO**

**Estudio de la Variabilidad Genética del *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) y virus relacionados existentes en camote [*Ipomea batatas* (L.)]**

**TESIS**

para optar el grado academico de Magister en Biología Molecular

**AUTOR**

Milton Untiveros Lázaro

**ASESOR**

Pablo Ramírez Roca

Jan Kreuze

**Lima – Perú**

**2010**

*A mis abuelos Gaudencio y Lucila*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quisiera agradecer a mis padres Demetrio y Mónica, y hermanos Erick y Mónica, por su constante apoyo a lo largo del tiempo que tomó terminar los estudios de maestría. Han sido ustedes siempre los que me han motivado a avanzar en mi carrera, a asumir nuevos retos para nuestro bienestar.

Quisiera también agradecer al Centro Internacional de la Papa por haberme brindado la oportunidad de desarrollar la tesis en sus instalaciones. Las gracias al Dr. Jan Kreuze, maestro y amigo, de quien siempre recibí no solo las mejores enseñanzas académicas y técnicas de la biología molecular, sino que también valiosos consejos para el desarrollo de mi vida profesional.

Muchas gracias a los profesores de la maestría de biología molecular, al Dr Pablo Ramírez, a las profesoras Débora Alvarado, Ruth García, Egma Mayta y Rina Ramírez, miembros del jurado calificador y esmerados maestros que desinteresadamente nos transmitieron sus conocimientos en este novedoso campo de la biología. Quiero extender mis gratitudes a mis entrañables compañeros de estudios: Frank Guzmán, Fernando de la Cruz, Walter Suárez, José Gonzales, Pol Carbajal, Roxana Mestas, Patty Galván, Richard Negron, Luis Tataje, Yohana Quiroz y Joseph Pinto, por haber sido un grupo tan unido y haber colaborado para que todos nosotros concluyéramos nuestros estudios.

Mis agradecimientos a mis colegas y amigos del CIP, a todos con quienes en su momento compartimos un ambiente de trabajo agradable, divertido, y de soporte mutuo; gracias a Ada Sumi, Gabriela Lajo, Lorena Da Ponte, José Tovar, Milagros Ormachea, Cinzia Riccio, Kathy Prentice, Diego Pignataro, Fernando Serna, Rosalina Tincopa, Wilbert Cruz, Lina Bernaola y Percy Rojas.

Finalmente, quiero agradecer a personas que con sus consejos, amistad, y cariño constante contribuyeron valiosamente a mi desarrollo como persona; a mi primo Aldo Lázaro y su familia, a mis amigos de siempre Paúl Dávila, Karin Calle, Jorge Tenorio, y Claudia Gutiérrez; y de manera muy especial a Dora Quispe, compañera y cómplice en la etapa final de esta aventura.

## CONTENIDO

	Pág
Contenido	iii
Índice de Tablas	v
Índice de Figuras	vi
Índice de Anexos	viii
Lista de Abreviaturas	ix
Resumen	x
Abstract	xi
I Introducción	1
II Antecedentes	3
2.1 Generalidades de los virus fitopatógenos	3
2.2 Enfermedades virales que afectan al camote	4
2.3 Género <i>Potyvirus</i>	7
2.3.1 Características generales	7
2.3.2 Taxonomía	8
2.3.3 Variabilidad molecular	10
2.4 Potyvirus que afectan el camote	11
2.4.1 <i>Sweet Potato Feathery Mottle Virus</i> (SPFMV)	11
2.4.2 <i>Sweet Potato Virus 2</i> (SPV-2)	13
2.4.3 <i>Sweet Potato Virus G</i> (SPVG)	14
2.4.4 <i>Sweet potato latent virus</i> (SwPLV)	14
2.4.5 <i>Sweet potato mild speckling virus</i> (SPMSV)	15
2.4.6 Potyvirus que infectan al camote en Perú	15
2.5 Evidencia de la evolución de virus	16
2.6.1 Comparación de secuencias	16
2.6.2 Reconstrucción filogenética	17
III Hipótesis y Objetivos	18
IV Materiales y Métodos	19
4.1 Material biológico	19
4.2 Métodos experimentales	19
4.2.1 Colecta de muestras	19

4.2.2 Extracción de ARN total	19
4.2.3 Reacción de transcripción reversa	20
4.2.4 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	21
4.2.5 Clonamiento de fragmentos de PCR	21
4.2.6 Secuenciamiento de fragmentos obtenidos	23
4.2.7 Análisis de secuencias	24
4.2.8 Reconstrucciones Filogenéticas	24
4.2.9 Análisis de recombinación	25
4.2.9 Análisis de secuencias con otros potyvirus	25
V Resultados	27
5.1 Colecta de muestras	27
5.2 Extracción de ARN total	27
5.3 Amplificación y clonamiento del fragmento de interés	28
5.4 Análisis de secuencias de SPFMV	29
5.5 Análisis de identidad genética y reconstrucción filogenética	31
5.6 Análisis de recombinación	33
5.7 Análisis de las secuencias SPV2 y SPVG	39
5.8 Subgrupo “SPFMV” de potyvirus	41
VI Discusión	43
VII Conclusiones	49
VIII Referencias Bibliográficas	51
IX Anexos	64

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
1. Posición taxonómica, distribución y el vector de transmisión de los virus que afectan al camote según el ICTV.	6
2. Funciones conocidas de las proteínas maduras de los potyvirus.	9
3. Secuencias de los primers utilizados en las reacciones de RT-PCR, PCR, clonamiento y secuenciamiento total de la región de interés en aislamientos Peruanos de SPFMV.	22
4. Número de acceso de las secuencias que comprenden la región 3'- terminal de la proteína NIb, la cubierta proteica y la región 3'UTR del genoma de SPFMV, así como secuencias solo de la cubierta proteica del mismo virus obtenidas del banco de datos NCBI y que fueron utilizadas en el análisis bioinformático del presente estudio.	26
5. Muestras procesadas y aislamientos secuenciados en este estudio según las diferentes zonas productoras de camote del Perú.	27
6. Número de acceso de las secuencias nucleotídicas que fueron depositadas en el Genbank de los aislamientos de SPFMV peruanos, americanos y otros potyvirus.	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
1. Morfología de la partícula (arriba, cortesía del Dr J. Kreuze) y organización del genoma de un potyvirus (abajo).	8
2. (A) Síntomas severos de enanismo y clorosis de una planta afectada con SPVD, respecto a una planta sana. B) Síntomas foliares ocasionados por el SPVD (izquierda) con relación a una hoja sana.	20
3. Representación del plásmido vector de clonamiento pCR <sup>®</sup> 2.1 (Invitrogen) conteniendo el producto de PCR (1.8kb) amplificado en el presente estudio.	23
4. Extracciones de RNA total separadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.	28
5. Productos de reacciones de PCR (A) y digestiones enzimáticas (B) separadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.	29
6. Alineamiento múltiple de secuencias de la proteína de cubierta de diferentes aislamientos de SPFMV utilizado el algoritmo CLUSTAL W.	32
7. Valores de identidad nucleotídica y aminoacídica (en negrita) inter e intragrupal, calculados para los últimos 208 aa de la proteína NIb, la proteína de cubierta, la región hipervariable N-terminal de la CP y la región 3'UTR.	33
8. Árbol filogenético NJ de aislamientos de SPFMV, construido basándose en el modelo Tamura-Nei inferido de los alineamientos de secuencias nucleotídicas que codifican la proteína de cubierta de diferentes aislamientos de SPFMV.	34
9. Regiones genómicas en las que se visualizaron posibles eventos de recombinación luego de realizar el alineamiento múltiple de secuencias de aislamientos de SPFMV.	36

10. Detección de los aislamientos recombinantes C y YV.	37
11. Detección de los aislamientos recombinantes Eg1 y Eg9.	38
12. Alineamiento múltiple (A) y árbol filogenético Neighbor-Joining (B) generados con las secuencias génicas de la proteína de la cubierta de aislamientos de SPVG, y que incluye a la cepa peruana Hua2.	40
13. Árbol filogenético Neighbor-Joining generado con las secuencias génicas de la proteína de la cubierta de aislamientos de SPV2, y que incluye a la cepa peruana Hua3.	40
14. Árbol filogenético construido basándose en la secuencia nucleotídica de la proteína de la cubierta de varios potyvirus.	42



## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
1. Distribución de transiciones y transversiones de las secuencias nucleotídicas de la proteína de cubierta de aislamientos de SPFMV con respecto a la distancia genética con el modelo de saturación nucleotídica TN93.	64
2. Distribución de transiciones y transversiones de las secuencias nucleotídicas de la proteína de cubierta de aislamientos de SPVG (arriba) y SPV2 (abajo) con respecto a las distancias genéticas con los modelos de saturación nucleotídica F84.	65
3. Distribución de transiciones y transversiones de las secuencias nucleotídicas de la proteína de cubierta de aislamientos de especies del género de los <i>potyvirus</i> con respecto a la distancia genética con el modelo de saturación nucleotídica F84.	66
4. Resultados de la prueba de Modeltest aplicados a las secuencias nucleotídicas de la cubierta proteica de aislamientos de SPFMV.	67
5. Resultados de la prueba de Modeltest aplicados a las secuencias nucleotídicas de la cubierta proteica de aislamientos de SPVG.	68
6. Resultados de la prueba de Modeltest aplicados a las secuencias nucleotídicas de la cubierta proteica de aislamientos de SPV2.	69
7. Resultados de la prueba de Modeltest aplicados a las secuencias nucleotídicas de la cubierta proteica de aislamientos de potyvirus.	70
8. Denominación de la especie viral, aislamiento y el respectivo número de acceso al Genbank de las secuencias nucleotídicas de la proteína de cubierta de 51 potyvirus.	71
	72
	73

## LISTA DE ABREVIATURAS

FAO	Food and Agriculture Organization
INIA	Instituto Nacional de Innovación Agraria
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
3' UTR	Three prime untranslated region
5' UTR	Five prime untranslated region
RNA	Acido ribonucleico
DNA	Acido desoxirubonucleico
DEPC	Dietil pirocarbonato
Rpm	Revoluciones por minuto
CDNA	ADN complementario
μL	microlitro
μg	microgramo
mg	miligramo
dNTPs	deoxyribonucleotide triphosphate
dGTP	deoxyribonucleotide triphosphate
dATP	deoxyribonucleotide triphosphate
dTTP	deoxyribonucleotide triphosphate
dCTP	deoxyribonucleotide triphosphate
ATP	Adenosin three phosphate
LB	Luria Broth
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
X-Gal	bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside
ppm	partes por millón
CP	Proteína de Cubierta
MgCl	Cloruro de Magnesio
TBE	Tris-borato-EDTA
CIP	Centro Internacional de la Papa
Kb	Kilobase
KCl	Cloruro de potasio
HCl	Ácido clorhídrico
TRIS-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethane - HCl
KDa	Kilodaltons

## RESUMEN

En el Perú son varios los potyvirus que se encuentran infectando el camote (*Ipomoea batatas*), siendo el mas común el *Sweet potato feathery mottle* (SPFMV). Sin embargo, actualmente no existen datos de secuencia nucleotídica par estos virus. En el presente estudio, se determinaron y analizaron los datos de la secuencia nucleotídica de la región 3' terminal (~1800 pb) de 17 aislamientos de potyvirus colectados de campos que se encuentran en las seis principales zonas de cultivo de camote en el Perú. Los resultados de la comparación de secuencias y análisis filogenéticos mostraron que tres de las cuatro cepas que son reconocidas dentro del SPFMV, se encuentran en el Perú, incluyendo la cepa Este de Africa. Del mismo modo, se encontraron aislamientos pertenecientes de otros dos potyvirus denominados *sweet potato virus G* (SPVG) y *sweet potato virus 2* (SPV2). Análisis posteriores revelaron que SPFMV, SPVG y SPV2 son virus relacionados y forman una línea filogenética dentro del genero Potyvirus que tienen como hospederos a plantas del genero *Ipomoea*. El estudio también reporta la ocurrencia de eventos de recombinación entre aislamientos de diferentes cepas de SPFMV.

## ABSTRACT

Several potyviruses are found infecting sweet potato (*Ipomoea batatas*) in Peru, of which sweet potato feathery mottle virus (SPFMV, genus Potyvirus) is the most common. However, sequence data for these viruses are not available from Peru. In this study, the 3'-terminal ~1,800 nucleotide sequences of 17 potyvirus samples collected from the six main sweet potato-producing areas of Peru were determined and analyzed. Results of sequence comparisons and phylogenetic analysis showed that three of the four recognized SPFMV strain groups, including the East African strain, are established in Peru as well as two other potyviruses: *sweet potato virus G* (SPVG) and *sweet potato virus 2* (SPV2). The analysis further revealed that SPFMV, SPVG and SPV2 are related and form an *Ipomoea*-specific phylogenetic lineage within the genus Potyvirus and identified for the first time recombination events between viruses from different strain groups of SPFMV.

## I. INTRODUCCIÓN

El camote [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] es una planta dicotiledónea perteneciente al género *Ipomoea* de la familia *Convolvaceae* y es el único miembro de este género que tiene importancia económica (Onwueme y Charles, 1994). Con más de 125 millones de toneladas producidas en el 2007, el camote es el séptimo cultivo en importancia en el mundo y el quinto en países en desarrollo. Asia es el continente con mayor producción con más del 88%, siendo China el principal productor mundial, con más de 100 millones de toneladas. África concentra el 8.5% de producción mientras que América el 2.2%. En nuestro país se produjeron 184,765 toneladas en el 2007 (FAO, 2008), siendo el valle de Cañete la principal área productora. En los años recientes el cultivo de esta raíz se viene incrementando en otras zonas como Huaral y el norte del país.

Debido a su fácil manejo y a su rusticidad, el camote ha sido tradicionalmente cultivado por agricultores de escasos recursos económicos, motivo por el cual durante muchos años ha sido considerado un cultivo de subsistencia, permaneciendo relegado del estudio científico por mucho tiempo. Sin embargo, desde la década de los ochenta, gracias al apoyo de instituciones como el Centro Internacional de la Papa (CIP), el camote está siendo reconsiderado como uno de los cultivos más importantes principalmente en los países en desarrollo, los cuales lo están incluyendo en sus programas de prevención de desnutrición infantil por la elevada concentración de carbohidratos y beta carotenos presente en sus raíces.

Muchas son las enfermedades que atacan el cultivo del camote, destacándose entre éstas las de origen viral. Se han reportado más de 20 virus que infectan los cultivos de camote en diferentes lugares del mundo (Salazar y Fuentes, 2000). Actualmente, se tiene identificado al SPVD (*Sweet potato Virus Disease*) como la principal enfermedad de origen viral que afecta este cultivo en el ámbito mundial, ocasionando pérdidas en el rendimiento que pueden llegar hasta un 90% (Milgram *et al.*, 1996; Gutierrez *et al.*, 2003).

El SPVD es una enfermedad ocasionada por una interacción sinérgica entre dos virus: SPFMV (*Sweet potato feathery mottle virus*) y el SPCSV (*Sweet potato chlorotic stunt virus*); y actualmente se ha determinado su mecanismo de acción (Karyeija *et al.*, 2000). El SPFMV (género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*), es un virus flexuoso que afecta al camote en todo el mundo (Moyer y Salazar, 1989). La caracterización molecular del gen que codifica la cubierta proteica del virus ha revelado la existencia de cuatro cepas: EA (Este de África); RC (*russet crack*), O (ordinario), y C (común). En infecciones únicas, las diferentes cepas del virus inducen síntomas muy leves, lo que cambia al coinfectar una planta junto al SPCSV y generar el SPVD, que induce síntomas muy severos. Se ha reportado que en una planta afectada por SPVD, el SPCSV es el responsable de la sinergia, permitiendo que la concentración del SPFMV se incremente. No obstante ello, la severidad de síntomas de SPVD depende no de la concentración pero sí de la cepa del SPFMV involucrada en la enfermedad (Kokkinos y Clark, 2006). Asimismo, se sabe que el SPCSV podría generar sinergismos menos severos con otros potyvirus (Untiveros *et al.*, 2007).

Actualmente, el SPFMV y el SPVD se encuentran diseminados en las principales zonas productoras de camote del país. Sin embargo, se conoce muy poco sobre la variabilidad genética del SPFMV y el efecto que ésta puede tener en la generación de SPVD con variaciones en la sintomatología así como la variabilidad molecular de otros potyvirus. Por lo tanto, se hace necesaria la realización de un estudio de caracterización molecular de aislamientos de SPFMV y otros potyvirus obtenidos de camote procedente de diversas zonas productoras del Perú que permita conocer su variabilidad mediante el secuenciamiento de la región que comprende al gen que codifica la cubierta proteica del virus y su comparación, mediante análisis bioinformático, con otras secuencias previamente reportadas de los virus. La información que se obtenga sobre la variabilidad genética de aislamientos peruanos de SPFMV y otros potyvirus, contribuirá en futuros estudios epidemiológicos del virus en el país, así como en el desarrollo de métodos de detección del virus y en la búsqueda o desarrollo de genotipos resistentes al SPVD.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de los virus fitopatógenos

*Matthews* (1991) define un virus como “un conjunto de uno o más moléculas patrones de ácidos nucleicos, normalmente encapsulados en una o más cubiertas de proteínas o lipoproteínas, los cuales tienen la capacidad de organizar su propia replicación únicamente en células hospederas” y a una especie viral como “una clase politética de virus que constituye un linaje replicativo y que ocupa un nicho ecológico particular”. Esto es, una especie normalmente contiene muchos tipos de variantes como cepas o serotipos (*Van Regenmortel et al.*, 1990). Históricamente la taxonomía de virus ha estado basada en propiedades como el rango de hospederos, la morfología de la partícula viral, y las reacciones serológicas; sin embargo, actualmente, está principalmente basada en el tipo y la secuencia del ácido nucleico (*Fauquet et al.*, 2005).

Según el VIII reporte del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (*Fauquet et al.*, 2005), en la actualidad existen 78 géneros, 62 de los cuales se encuentran clasificados en 19 familias de virus de plantas, junto a otros 16 géneros no asignados. Una de las principales características de los virus en plantas es su amplio rango de hospederos, siendo el caso más resaltante el *Cucumber mosaic virus* (CMV) o virus de la mancha del pepino, que infecta a más de 200 especies pertenecientes a 20 familias de plantas (*Chamberlain*, 1954). Otra característica particular de los virus de plantas es su dependencia de un vector para su transmisión. Para infectar una planta, los virus deben atravesar la pared celular, lo cual logran de manera natural utilizando agentes biológicos como vectores entre los que se encuentran animales, insectos, hongos y nematodos (*Khan y Dijkstra*, 2002; *Trigiano et al.*, 2003). Los insectos son los vectores más importantes de virus debido a su abundancia y hábitos alimentarios, y están involucrados en la transmisión del 70% de los virus conocidos (*Francki et al.*, 1991).

Los virus fitopatógenos son la principal amenaza para la alimentación y el suministro de combustibles ya que ellos causan hasta el 40% de pérdidas en rendimiento de los cultivos (Khan y Dijkstra, 2002). Existen varios ejemplos de enfermedades virales con gran impacto económico a lo largo de las décadas pasadas. En la década del noventa, el virus del mosaico de la yuca (ACMV) causó el 50% de pérdidas de producción de yuca (*Manihot esculenta*), llevando a Uganda a una seria hambruna con abundantes pérdidas económicas. Igual efecto fue causado por las epidemias del Virus de la Tristeza en cítricos (CTV) en países americanos (Wutscher, 1977), así como por el Virus de la Enfermedad de los Tallos Ensanchados (SSVD) con la muerte de millones de árboles de cacao (*Theobroma cacao*) (Thresh, 1986). En el Perú, el virus de la mancha anillada de la papaya (*Carica papaya*) ha causado grandes pérdidas en la producción de este cultivo reduciendo su producción hasta en 50% (INIA, 2007).

## **2.2 Enfermedades virales que afectan al camote**

Aunque los primeros reportes de ocurrencia de los virus que afectan al camote datan de la década de 1930 (Moyer y Salazar, 1989), los principales avances en el conocimiento de estos virus se han dado en los últimos años. Así, gracias al avance en las técnicas de la microscopía electrónica, serología y biología molecular, se ha logrado el desarrollo de mejores y sofisticados métodos de detección, identificación y caracterización de estos virus que incluyen: 1) los ensayos inmunológicos de inmunoprecipitación y aglutinación, 2) las pruebas de ELISA y 3) la microscopía electrónica de inmuoabsorción (ISEM); las técnicas moleculares como 1) la hibridación de ácidos nucleicos (NASH) y 2) la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa previa transcripción reversa (RT-PCR). Asimismo, se tienen secuenciados diferentes aislamientos de al menos 10 virus entre ellos SPFMV y el SPCSV (Sakai *et al.*, 1997; Kreuze *et al.* 2009). Sin embargo, debido a que algunos reportes señalan la ocurrencia de síntomas típicos de infecciones virales en muestras de campo o de bancos de germoplasma, y que al ser evaluados reaccionan negativamente a las pruebas de diagnóstico,



no se descarta la posible existencia de nuevos virus (Colinet *et al.*, 1993; Mukasa *et al.*, 2003a).

El camote es un cultivo de propagación vegetativa y aunque éste resulta ser efectivo para el camote, suele al mismo tiempo, proporcionar a los virus un mecanismo efectivo de diseminación y perpetuación, incluso sin la aparente necesidad de contar con un vector específico (Clark y Moyer, 1988). Este tipo de propagación incrementa el riesgo de que el virus o los virus aumenten su acumulación en la planta generando frecuentemente daños más severos cuanto más veces es propagado (Onwueme y Charles, 1994, Di Feo *et al.*, 2000). Asimismo, al permitir la perpetuación de un virus a menudo se dan situaciones de infecciones virales mixtas que suelen ser el principal problema para un adecuado estudio y caracterización de un virus (Clark y Moyer, 1988; Moyer y Salazar, 1989) y a su vez podrían originar la ocurrencia de sinergismos virales (Untiveros *et al.*, 2007). Un sinergismo viral se da cuando, en una infección mixta, uno de los virus asiste de alguna manera a otros(s) resultando en un incremento de las concentraciones virales y de la severidad de los síntomas causado por las infecciones aisladas de cada uno de los virus (Matthews, 1991). En el camote, no es raro encontrar coinfecciones o infecciones mixtas de virus de diferentes géneros en muestras provenientes de campo (Gutierrez *et al.*, 2003). El *Sweet potato virus disease* (SPVD) es el principal problema viral que afecta el camote y es causada por la acción sinérgica entre el *Sweet potato chlorotic stunt*, SPCSV, género *Crinivirus*, con el *Sweet potato feathery mottle virus*, SPFMV, género *Potyvirus* (Gibson *et al.*, 1998; Gutiérrez *et al.*, 2003). En la actualidad se sabe que el SPCSV es el agente responsable del sinergismo ya que a través de su proteína RNase 3 rompe la resistencia natural que el camote tiene a SPFMV (Cuellar *et al.*, 2009) y permite que este último aumente su concentración viral hasta en más de 600 veces (Karyeija *et al.*, 2000). Este aumento origina los síntomas típicos del SPVD y reduce la producción en más del 80% (Milgram *et al.*, 1996; Gutierrez *et al.*, 2003). Se sabe además que SPCSV no sólo tiene efectos sinérgicos con el SPFMV, sino con otros virus de diferentes géneros que incluyen, los *Potyvirus*, *Ipomovirus*, *Cucumovirus*, y *Carlavirus* (Untiveros *et al.*, 2007; Cuellar *et al.*, 2009).

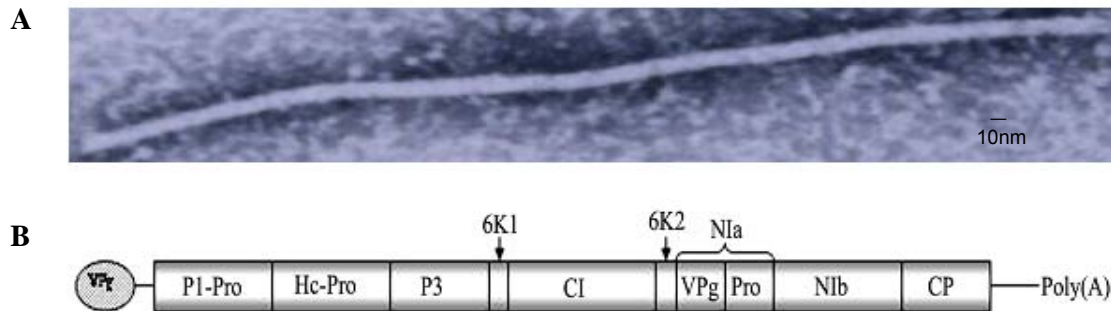
**Tabla 1.** Posición taxonómica, distribución y el vector de transmisión de los virus que afectan al camote según el ICTV (Fauquet *et al.*, 2005)

Virus	Género	Distribución	Transmisión
<b>Reconocidos por el ICTV</b>			
<i>Sweet potato feathery mottle virus</i> (SPFMV)	<i>Potyvirus</i>	Mundial	áfidos
<i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i> (SPCSV)	<i>Crinivirus</i>	Mundial	mosca blanca
<i>Sweet potato mild mottle virus</i> (SPMMV)	<i>Ipomovirus</i>	África, Indonesia, Papua Nueva Guinea, Filipinas India, Egipto	mosca blanca
<i>Sweet potato latent virus</i> (SwPLV)	<i>Potyvirus</i>	África, Egipto, Indonesia, Perú, China, India, Filipin.	desconocido
<i>Sweet potato mild speckling virus</i> (SPMSV)	<i>Potyvirus</i>	Argentina, Perú, Indonesia, Filipinas	áfidos
<i>Sweet potato virus G</i> (SPVG)	<i>Potyvirus</i>	Uganda, China, Egipto, India	áfidos
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	<i>Cucumovirus</i>	Israel, Egipto, Kenia	áfidos
<b>No reconocidos por el ICTV</b>			
<i>Ipomoea yellow vein virus</i> (IYVV)	Begomovirus	España	Mosca blanca
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> (SPLCV)	Geminivirus	EE.UU.	mosca blanca
<i>Sweet potato leaf curl Georgia virus</i> (SPLCGV)	Begomovirus	EE.UU.	mosca blanca
<i>Sweet potato yellow dwarf virus</i> (SPYDV)	<i>Ipomovirus</i>	Taiwán,	mosca blanca
<i>Sweet potato ringspot virus</i> (SPRSV)	<i>Nepovirus</i>	Papua Nueva Guinea	desconocido
<i>Sweet potato caulimolike virus</i> (SPCaV)	<i>Caulimovirus</i>	Puerto Rico, Islas Salomón, Australia, Papua Nueva Guinea	desconocido
<i>Sweet potato leaf speckling virus</i> (SPLSV)	<i>Luteovirus</i>	Perú, Cuba	áfidos
<i>Sweet potato chlorotic fleck virus</i> (SPCFV)	<i>Carlavirus</i>	Mundial	desconocido
<i>Ipomoea crinkle leaf curl virus</i>	Geminivirus	EE.UU.	mosca blanca
<i>Sweet potato vein mosaic virus</i> (SPVMV)	<i>Potyvirus</i>	Argentina	áfidos
<i>C-6 virus</i>	<i>Carlavirus</i>	Uganda, Indonesia, Filipinas, Perú	desconocido
<i>Sweet potato virus 2</i> (SPV2)	<i>Potyvirus</i>	Taiwán, India, Egipto, Perú	áfidos

## 2.3 Género *Potyvirus*

### 2.3.1 Características generales

El género *Potyvirus* es el más grande de los seis que conforman la familia *Potyviridae* entre los que tenemos a los Géneros *Bymovirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Macluravirus* e *Ipomovirus*. A excepción del género *Bymovirus*, que tiene un genoma bipartito (van Regenmortel *et al.*, 2000) todos los demás géneros de esta familia tienen un genoma monopartito. Los miembros del género *Potyvirus* son transmitidos mediante áfidos de manera no persistente, es decir son transportados en el estilete del áfido donde permanecen infectivos por un corto periodo de tiempo (minutos a pocas horas). En la actualidad, existen 129 miembros en este género constituyendo el más grande y el que mayores daños económicos ocasiona a la agricultura (Fauquet *et al.*, 2005). Casi el 30% de los virus fitopatógenos en la actualidad pertenecen a este género (Khan y Dijkstra, 2002). Los viriones de los potyvirus son partículas flexuosas en forma de cilindro de entre 680 y 900 nm de longitud y 11-15 nm de ancho como se aprecia en la Figura 1A (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). El genoma de estos virus consiste de una molécula de ARN de hebra simple y sentido positivo de alrededor de ~9.7kb que expresa una poliproteína de 340-370 kDa expresada en un único marco abierto de lectura (ORF), y una pequeña proteína PIPO (*pretty interesting potyvirus ORF*) recientemente descubierta (Chung *et al.*, 2008). La organización del genoma de los potyvirus puede ser apreciada en la Figura 1B. La región 5' terminal del genoma está anclada a la proteína de origen genómico VPg, en tanto la región 3' terminal está unida a una cola de poli-Adenina (poly-A). La poliproteína expresada es cortada por proteinasas codificadas por el mismo virus en 10 proteínas cuyas funciones son descritas en la Tabla 2. El estudio de los genomas de los potyvirus provee información útil que puede ser usada para el diseño eficiente de oligonucleótidos para la detección y distinción de diferentes especies y cepas de potyvirus mediante PCR, *microarrays* o síntesis de sondas para la hibridación de ácidos nucleicos.



**Figura 1.** Morfología viral A, (Sakai *et al.*, 1997) y organización del genoma de un *potyvirus* (B). En A se muestra un potyvirus en forma de partícula flexuosa, cilíndrico, entre 680 y 900 nm de longitud y 11-15 nm de ancho; y en B, el genoma que contiene un solo ORF, los nombres de los productos proteicos finales están indicados como rectángulos, separados por líneas que indican posibles sitios de corte de la poliproteína. Las regiones 5' y 3' UTR están indicadas por líneas. El RNA genómico es poliadenilado en el extremo 3' y tiene una proteína viral (VPg) unida al 5' UTR.

Existen algunas regiones conservadas en varios genes o regiones genómicas de los potyvirus. La región 3'UTR es relativamente conservada entre especies de potyvirus cercanamente relacionadas y cepas de una misma especie (Frenkel *et al.*, 1989; Uyeda, 1992). Las proteínas P1 y P3 son específicas para cada potyvirus (Shukla *et al.*, 1994). El gen NIb, o replicasa dependiente de RNA (RdRp) es relativamente conservado entre los genomas de potyvirus (Domier *et al.*, 1987; Hong y Hunt, 1996). Las secuencias nucleotídicas del gen de la proteína de cubierta proteica (CP) varían entre especies, pero es relativamente conservado dentro de una especie con epítopes que generalmente se localizan en la región N-terminal (Shukla y Ward, 1989a), lo cual es útil para la discriminación de especies y cepas (Sánchez *et al.*, 2003; Shukla y Ward, 1988; Shukla y Ward, 1989b)

### 2.3.2 Taxonomía

En la actualidad los datos de secuencias de ácidos nucleicos virales han reemplazado las características citopatológicas como el más importante criterio para la asignación de especies de virus a este género (Shukla *et al.*, 1994; Adams *et al.*, 2005). Los criterios más importantes en la definición de especies de potyvirus según el VIII reporte del ICTV (Fauquet *et al.*, 2005) son, que presenten 80% de similitud de secuencia aminoacídica de la proteína de cubierta y una identidad nucleotídica menor a 85% a lo largo de

todo el genoma. En estudio reciente de Adams *et al* (2005) acerca de los criterios moleculares para la discriminación de géneros y especies en la familia Potyviridae, investigaron 187 secuencias de genomas completos de miembros de esta familia y diferentes genes individuales que incluían el gen que codifica la proteína P1, los cuerpos de inclusión (CI) y la cubierta proteica (CP); los autores concluyen que el criterio para la demarcación entre especies debería ser un porcentaje de identidad nucleotídica menor a 76% y aminoacídica menor a 82% cuando se comparan secuencias genómicas completas.

**Tabla 2.** Funciones conocidas de las proteínas maduras de los potyvirus

Proteína	Funciones	Referencias
P1	Proteinasa	Carrington <i>et al.</i> , 1989
	Modulador de silenciamiento de genes	Anandalakshmi <i>et al.</i> , 1998
	Replicación/ propagación virus	Kekarainen <i>et al.</i> , 2002
Hc-Pro	Proteinasa	Carrington <i>et al.</i> , 1990
	Transmisión por áfidos	Atreya <i>et al.</i> , 1992
	Transmisión por semilla	Wittman <i>et al.</i> , 1997
	Supresor de silenciamiento de genes	Kasschau y Carrington, 1998
	Movimiento sistémico y de célula a célula	Kasschau y Carrington, 1997
	Replicación/ propagación virus	Kasschau y Carrington, 1995
P3	Amplificación del genoma	Merits <i>et al.</i> , 1999
6K1	Replicación del virus	Reichmann <i>et al.</i> , 1992
CI	Helicasa de RNA	Lain <i>et al.</i> , 1990
	Movimiento de célula a célula	Carrington <i>et al.</i> , 1998 Roberts <i>et al.</i> , 1998
6K2	Replicación del virus	Schaad <i>et al.</i> , 1996
	Movimiento de larga distancia	Rajamäki y Valkonen, 1999
	Inducción de síntomas	Spetz y Valkonen, 2004
Nla/Vpg	Se une a factores de iniciación eIF(iso) y eIF4E	Wittman <i>et al.</i> , 1997
	Movimiento sistémico y de célula a célula	Schaad <i>et al.</i> , 1997
	Replicación del virus	Schaad <i>et al.</i> , 1996
Nla/Pro	Proteasa	Dougherty <i>et al.</i> , 1989
Nlb	Polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp)	Hong y Hunt, 1996
CP	Encapsidación de RNA	Jagadish <i>et al.</i> , 1993
	Movimiento sistémico y de célula a célula	Dolja <i>et al.</i> , 1994
	Transmisión por afidos	Atreya <i>et al.</i> , 1995
	Transmisión por semilla	Wang y Maule, 1994
	Replicación/ propagación virus	Haldeman-Cahill <i>et al.</i> , 1998

### 2.3.3 Variabilidad molecular

#### a. Recombinación

Este fenómeno es la formación de moléculas de ácido nucleico quimérico a partir de segmentos que se hallan separados en la misma molécula o presente en diferentes moléculas parentales. Usualmente ocurre durante la replicación y es la mayor fuente de variación, pudiendo ser además un mecanismo de reparación para aberraciones resultantes de mutaciones. Los estudios de evolución de virus de RNA, han demostrado que la existencia de virus recombinantes es un fenómeno muy común (MacFarlane, 1997; Roossinck, 1997). Los potyvirus son los que muestran la mayor frecuencia de recombinación (Chare y Holmes, 2006). Revers *et al.* (1996) reportan a 4 especies diferentes en 18 aislamientos de potyvirus que fueron reconocidos como virus recombinantes, siendo el más prevalente el Potato virus Y (PVY). Recientemente, un aislamiento de *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) fue identificado con sitios de recombinación entre las proteína 6K1 y CI (Zhong *et al.*, 2005). Al analizar la región C-terminal de la proteína NIb, la CP y la región 3'UTR de 27 aislamientos de *Yam mosaic virus* (YMV) se halló que tiene la CP más variable cuando es comparado con otros 8 potyvirus (Bousalem *et al.*, 2000). Además no se encontró correlación entre las identidades y filogenias de la CP y la región 3'UTR. Eventos adicionales de recombinación en potyvirus fueron reportados por Glais *et al.*, (2002), Desbiez y Lecoq (2004), Tan *et al.* (2004), Glasa *et al.* (2004), entre otros.

#### Mutaciones puntuales

Las mutaciones puntuales consisten en el reemplazo de una base por otra en un sitio en particular o en la delección o adición de un nucleótido. A diferencia de las DNA polimerasas que tiene una habilidad de “*proofreading*” (que elimina la base nucleotídica incorrecta y coloca la base correcta) las RNA polimerasas no contienen los dominios de actividad exonucleolítica correctora 5'-3' (Hansen *et al.*, 1997). Como consecuencia del cambio de una sola base se puede dar tres situaciones: (1) el reemplazo de un

aminoácido por otro en una proteína viral; (2) la introducción de un nuevo codón de término y la consecuente terminación temprana de la traducción y la generación de un polipéptido más pequeño que el original; y (3) el reemplazo por un codón que tenga ya sea un mayor o menor uso en un hospedero en particular. Debido a la alta tasa de errores en la replicación, los virus de RNA sufren cambios genéticos muy rápidos, resultando en poblaciones heterogéneas de secuencias de RNA relacionada que se mencionan a menudo como “*quasi*” especies (Domingo y Holland, 1997; Rubio *et al.*, 1999). Uno de los casos mejor estudiados en este tipo de mutaciones lo constituyen las diferencias encontradas entre dos cepas de *Alfalfa mosaic virus* (AMV) en las cuales 15 substituciones aminoacídicas pueden ser explicadas por substituciones nucleotídicas (Castel *et al.*, 1979).

## **2.4 Potyvirus que afectan el camote**

### **2.4.1 Sweet Potato Feathery Mottle Virus (SPFMV)**

El SPFMV se encuentra en todas las regiones del mundo en el cual se cultiva camote (Moyer y Salazar, 1989). El SPFMV es un virus flexuoso de 810-865 nm perteneciente al genero *Potyvirus* en la familia *Potyviridae*, su genoma monopartito es una molécula de ARN de hebra simple y sentido positivo constituido por 10599 nucleótidos y está encapsulado por una cubierta proteica de 38 KDa de peso molecular (Sakai *et al.*, 1997; Clark y Moyer, 1988; Abad *et al.*, 1992a). Fue reportado por primera vez en los países del Este africano y denominado virus A del camote por Sheiffeld (1957). Mediante análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas de la cápside proteica de varios aislamientos del SPFMV se divide a este virus en cuatro grandes cepas: 1) la EA (Este de África) conformado por aislamientos en su mayoría procedentes de países del Este africano; 2) la RC (*russet crack*), conformado por aislamientos procedentes de Norteamérica, Japón y Corea; 3) la O (ordinario) conformado por aislamientos procedentes de China, Japón, Corea, Nigeria, Níger y Argentina; y, finalmente; la 4) C (común) conformado por aislamientos provenientes de EE.UU, China y Argentina (Kreuze *et al.*, 2000).

El SPFMV se transmite de manera no persistente y no circulativa por áfidos que no colonizan el cultivo (*Myzus persicae*, *Aphis gossypii* y *Aphis cracivora*) (Kennedy y Moyer 1982; Aritua *et al.*, 1998). Los síntomas observados en camote dependen en gran parte de la variedad de la planta ya que muchas presentan infecciones asintomáticas dependiendo del estado de desarrollo y el grado de estrés. Sin embargo, al presentarse los síntomas son generalmente suaves y pasajeros e incluyen: aclaración de venas, plumado de venas y manchas púrpuras o cloróticas. Todos estos síntomas suelen expresarse especialmente en las hojas más antiguas. Sólo los aislamientos de la variante RC pueden dañar las raíces reservantes de algunas variedades y causar lesiones externas y corchosis interna (Clark y Moyer 1988). El SPFMV se encuentra en concentraciones muy bajas especialmente en hojas asintomáticas de plantas infectadas únicamente con este virus (Abad *et al.*, 1992), debido a esto, generalmente no es detectable a través de pruebas serológicas: ISEM, DAS y NCM-ELISA (Moyer y Kennedy, 1978; Abad *et al.*, 1992). Sin embargo, es posible detectarlo de manera temprana mediante el uso de sondas específicas o de amplio espectro en pruebas de NASH (Abad *et al.*, 1992, Querci *et al.*, 1992). Asimismo, es detectado mediante el uso de *primers* específicos para la especie viral o degenerados para el género (Colinet *et al.*, 1998, Kreuze *et al.*, 2000; Tairo *et al.*, 2004). Este virus no suele causar una disminución significativa en el rendimiento del cultivo en condiciones de campo, e incluso se han reportado rendimientos mayores a los obtenidos con plantas sanas. Esta situación cambia cuando el SPFMV infecta a una planta junto a otro virus denominado *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) o “virus de la mancha clorótica”, generándose un sinergismo viral que ocasiona una disminución del rendimiento del cultivo de hasta un 80% (Gutierrez *et al.*, 2003; Milgram *et al.*, 1996).



#### **2.4.2 Sweet Potato Virus 2 (SPV-2)**

El virus SPV-2 fue reportado por primera vez en Taiwan (Rossel y Thottappilly, 1988). En la actualidad, existen reportes de su distribución a nivel mundial (EEUU, Taiwan, Australia, Nigeria, Sud Africa, China, Portugal y Zambia) (Ateka *et al.*, 2007; Tairo *et al.*, 2006). El SPV-2 es una partícula filamentosa de 850 nm de longitud y como todos los potyvirus es transmitido por áfidos de manera no persistente y su rango de hospederos incluye las especies del género *Ipomoea*. Este virus induce síntomas que van desde el aclaramiento de venas y mosaicos hasta la deformación de las hojas (Loebenstein *et al.*, 2003). Basados en los síntomas iniciales que induce en camote, por mucho tiempo se pensó que este virus era un aislamiento del SPFMV, sin embargo estudios detallados de la caracterización biológica y serológica determinaron que éste era un virus diferente no relacionado a ningún otro potyvirus (Rossel y Thottappilly, 1988; Ateka *et al.*, 2004). La caracterización molecular de la secuencia genómica de la región 3' terminal confirmó la inclusión de este virus al género de los Potyvirus (Ateka *et al.*, 2004). En la actualidad se reconocen cuatro grupos filogenéticos de aislamientos, con la particularidad de que cada grupo procede de diferentes áreas geográficas, y por el contrario, aislamientos provenientes de un mismo país forman parte de grupos filogenéticos diferentes (Ateka *et al.*, 2007). En la actualidad es posible detectar al SPV-2 mediante anticuerpos policlonales disponibles producidos por el CIP. Aunque no existen estudios cuantitativos del efecto de este virus en el rendimiento del cultivo, se presume que de manera similar al SPFMV, el SPV-2 no causa mayores pérdidas en infección única; sin embargo, dado que algunos reportes señalan la ocurrencia de síntomas severos similares al del SPVD en coinfección con el SPCSV (Ateka *et al.* 2007; Souto *et al.*, 2003) se presume que el rendimiento del cultivo en el campo podría verse seriamente afectado.

### **2.4.3 Sweet Potato Virus G (SPVG)**

El SPVG fue inicialmente descubierto en China (Colinet *et al.*, 1994), y como todo potyvirus es transmitido por áfidos (Souto *et al.*, 2003). Al igual que con SPV2, los síntomas que genera en *Ipomoea nil* y en camote son parecidos a los de SPFMV; sin embargo a diferencia de éste, el SPVG genera síntomas más suaves en *I. setosa*, en donde se presenta recuperación de la planta (Souto *et al.*, 2003). A pesar de ello este virus se ha diseminado silenciosamente en todo el mundo, creyéndose erróneamente que era una cepa de SPFMV. En la actualidad, este virus es detectado en campos de cultivo de EEUU, China, Egipto, Etiopía, Sudáfrica y algunos países de Oceanía (Rännäli *et al.*, 2008), mientras que no existen reportes de su diseminación en países del Este africano (Ateka *et al.*, 2004; Mukasa *et al.*, 2003b; Tairo *et al.*, 2004).

### **2.4.4 Sweet potato latent virus (SwPLV)**

Fue reportado por vez primera en campos de cultivo de camote en Taiwán y originalmente fue denominado SPV-N (Liao *et al.*, 1979). Actualmente, el SwPLV ha sido reportado en África, Asia y Perú (Salazar y Fuentes, 2000). El SwPLV es un virus flexuoso, alargado, de aproximadamente 750 nm de longitud. Los estudios en el secuenciamiento del gen de la proteína de la cápside de aislamientos de SwPLV de China y Taiwán revelan que ambos grupos geográficos pertenecerían a diferentes variantes; por ello se ha clasificado a los aislamientos de China como miembros de la variante SwPLV-CH mientras los aislamientos taiwaneses pertenecerían a la variante SwPLV-T (Colinet *et al.*, 1997). No obstante, ambas variantes diferirían en cuanto a su transmisión debido a una mutación en la región génica de la cápside proteica denominada caja DAG, en la variante SwPLV-T, esta mutación no permitiría su transmisión por áfidos (Colinet *et al.*, 1997). Existen variantes capaces de ser transmitidas mediante áfidos (Colinet *et al.*, 1997) y otras no (Clark y Moyer, 1988; Colinet *et al.*, 1997). Los síntomas que causa el SwPLV son el bandeado de venas y

mosaico en *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana clevelandii* hospederos que resultan buenos para el mantenimiento del virus. Asimismo, causa lesiones locales en *Chenopodium amaranticolor* y *C. quinoa*, mientras que en *I. nil* causa el bandeado de venas y mosaico que van desapareciendo al crecer la planta. No causa síntomas en camote (Clark y Moyer, 1988).

#### **2.4.5 Sweet potato mild speckling virus (SPMSV)**

Este virus se encuentra actualmente distribuido en África (Uganda, Kenia), Asia (Indonesia, Egipto China, India, Filipinas), Perú y Brasil (Salazar y Fuentes, 2000). El SPMSV es un virus flexuoso que ha sido clasificado dentro del género *Potyvirus* gracias a estudios de caracterización molecular de la proteína de la cubierta (Álvarez *et al.*, 1998). En Argentina, el virus fue reportado y aislado de plantas de camote infectadas con un complejo viral denominado SPCD (Enanismo clorótico) (Di Feo *et al.*, 2000). El SPMSV es transmitido por el áfido *Myzus persicae*; sin embargo, el virus no reacciona positivamente con los anticuerpos monoclonales PTY1 que reconocen epítopes involucrados en la transmisión de potyvirus mediante áfidos (Di Feo *et al.*, 2000). El rango de hospederos de SPMSV está restringido a especies de la familia *Convolvulacea*, *Chenopodaceae* y *Solanaceae* (Fuentes, 1994). En camote el SPMSV no genera síntoma alguno. Actualmente el virus es detectable mediante pruebas de DAS y NCM-ELISA (Di Feo *et al.*, 2000).

#### **2.4.6 Potyvirus que infectan al camote en Perú**

Actualmente se cuentan con pocos estudios de potyvirus que infectan el camote en el Perú. Cucho (1993) reportó por primera vez el SPFMV en los valles del sur chico (Nazca, Palpa, Cañete, Pisco, Ica, y Chincha). En tanto, Gutiérrez *et al.*, (2003) reportaron la presencia SwPLV y SPMSV en el valle de Cañete con bajas incidencias respecto al SPFMV. En este estudio, se obtuvieron tres aislamientos de SPFMV (C-18, M2-41 y M2-44) basados en el rango de hospederos, severidad de síntomas y reacciones serológicas. Además se logró determinar una alta incidencia del SPVD en este valle. Actualmente no existe información sobre la presencia de potyvirus en otros

valles costeros con excepción de los ubicados en el sur chico. Por otro lado, se ha reportado aislamientos de virus pertenecientes a otros géneros que afectan al camote, entre ellos el SPCFV, SPLSV, Virus C-6 y SPCSV (Fuentes y Salazar, 1992; Fuentes, 1994; Gutiérrez *et al.*, 2003)

## **2.5 Evidencia molecular de la evolución de virus**

La mayoría de ideas y conceptos acerca de la evolución viral están basados en los datos moleculares que se vienen acumulando cada año. Las evidencias obtenidas de las rutas evolutivas de muchos virus de plantas se basan en la comparación de la organización de sus genomas y en las diferencias de sus secuencias. Existe una variedad de métodos utilizados para inferir filogenias u otras relaciones de secuencias (Weiller *et al.*, 1995). El principal objetivo de estos métodos es analizar los datos de secuencia de los ácidos nucleicos o los aminoácidos de tal manera que revelen alguna relación filogenética. Los detalles teóricos y los métodos prácticos del análisis molecular de la información de secuencias han sido tratados ampliamente en varias publicaciones (Waterman, 1998; Doolittle, 1990; Gribskov y Devereux, 1991)

### **2.5.1 Comparación de secuencias**

Las secuencias son a menudo comparadas mediante el uso de programas bioinformáticos. Existen dos métodos para alinear secuencias: los métodos globales que intentan encontrar un “alineamiento óptimo” a través de la longitud de las secuencias y los métodos locales que sólo intentan identificar regiones cortas de similitud y no intentan alinear las secuencias entre estas regiones. Existe una gran variedad de programas de alineamiento de secuencias (McClure *et al.*, 1993), con éstos es posible identificar motivos conservados en secuencias que son características de proteínas específicas.

### **2.5.2 Reconstrucción filogenética**

Los alineamientos de secuencias múltiples no permiten una fácil interpretación de las rutas o relaciones evolutivas. Para ello, existen dos métodos de reconstrucción de filogenia: los métodos fenéticos que usan datos fenotípicos en un intento de reconstruir la filogenia sin un total entendimiento de la ruta evolutiva, y por otro, los métodos cladísticos que se concentran en la ruta evolutiva intentando predecir los ancestros. En la práctica, puede ser igualmente útil usar los métodos que involucran una combinación de criterios fenéticos y cladísticos. Las relaciones filogenéticas son a menudo presentadas como estructuras que se parecen a árboles o dendogramas, los cuales están constituidos de varias partes denominadas: raíz, ramas, nodos y hojas. Existen varios estilos de dendogramas y varios métodos para su construcción. Sin embargo, para la determinación de la ruta evolutiva, es importante reconocer las limitaciones de los distintos tipos de dendogramas, así como la evaluación estadística de la generación de ramas dentro de este árbol.

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipótesis**

##### **Hipótesis de trabajo**

La ocurrencia de diversas cepas de SPFMV en una misma zona geográfica ha sido previamente reportada, por lo que se encontrará variabilidad genética en los aislamientos peruanos que se clasificarán en diferentes cepas de SPFMV y otros potyvirus.

##### **Hipótesis alterna**

No se encontrará variabilidad genética en los aislamientos peruanos de SPFMV y otros potyvirus.

#### **3.2 Objetivos Generales**

1. Determinar la variabilidad genética de aislamientos del virus SPFMV y otros potyvirus relacionados para conocer la presencia de cepas de estos virus en distintas zonas camoterías del Perú.

#### **3.3 Objetivos Específicos**

1. Amplificar mediante PCR la región conservada 3' terminal del genoma de todos los aislamientos colectados.
2. Clonar los amplicones obtenidos en vectores específicos.
3. Diseñar iniciadores que permitan el secuenciamiento completo de la región amplificada.
4. Analizar las distancias genéticas y filogenia de las secuencias obtenidas mediante el uso de programas bioinformáticos.
5. Detectar la ocurrencia de eventos de recombinación entre aislamientos de SPFMV.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Material biológico**

Para este estudio, se utilizaron hojas con síntomas provenientes de plantas infectadas con SPVD y recolectadas de las principales zonas productoras de camote del país (ver Métodos)

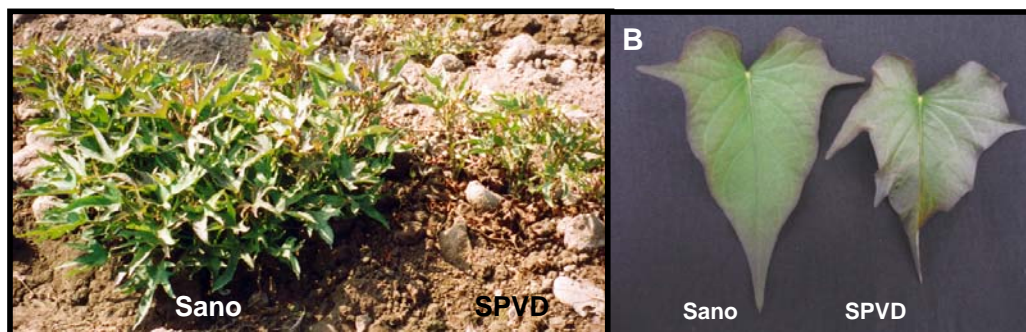
### **4.2 Métodos experimentales**

#### **4.2.1 Colecta de muestras**

Para la colecta de las muestras, se seleccionaron las áreas de mayor producción de camote en el Perú: Cañete, Ferreñafe, Huaral, Chimbote, San Ramón y Piura. Con la excepción de las muestras tomadas en Piura (Valle del Chira), en donde no se observaron campos infectados con SPVD, todas las demás muestras provinieron de campos de camote con presencia de síntomas de SPVD (Figura 2). Para la toma de muestras se procedió según lo establecido en la sección 2.1.1 del Manual de Técnicas de Virología de plantas del CIP (Salazar y Jayasinghe, 1997). Las muestras consistieron en esquejes que fueron previamente fumigados para la eliminación de plagas y enfermedades de origen fúngico o bacteriano antes de ser introducidas en los invernaderos del área de Virología del CIP para su mantenimiento. Asimismo, se incluyeron en este estudio algunas muestras liofilizadas de aislamientos que se obtuvieron años antes de la realización de este trabajo.

#### **4.2.2 Extracción de RNA total**

Se utilizó el método del TRIZOL (Invitrogen®) con algunas modificaciones que se describen brevemente a continuación: se trituró aproximadamente 200 mg de tejido vegetal (hojas sintomáticas) o 20 mg de tejido liofilizado en un tubo para microcentrífuga estéril conteniendo 1 mL de Trizol. El tejido triturado fue mezclado en un vortex durante 2 minutos y se centrifugó a 10000 x g por 5 min.



**Figura 2.** A) Síntomas severos de enanismo y clorosis de una planta afectada con SPVD, respecto a una planta sana. B) Síntomas foliares ocasionados por el SPVD (izquierda) con relación a una hoja sana.

Luego se transfirió el sobrenadante a otro tubo agregándole 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{CHCl}_3$  (cloroformo), y dejándose agitar en *vortex* por 30 segundos e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifugó a 10000 x g durante 5 min a 4°C transfiriéndose la fase acuosa a un tubo con 750  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Éste se centrifugó a 10000 x g durante 20 minutos a 4°C y el *pellet* formado fue lavado con etanol 75% mediante centrifugación a 10000 x g por 5 minutos. Posteriormente, se resuspendió el sedimento en 250  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas (tratada con DEPC) y una vez disuelto totalmente, se agregó 250  $\mu\text{L}$  de LiCl 4M y se incubó a 4°C toda la noche. Finalmente, se centrifugó la anterior mezcla a 10000 x g durante 20 min, se lavó el *pellet* con etanol 75%, y se centrifugó 10000 x g por 5 min. El *pellet* final fue resuspendido en 100  $\mu\text{L}$  de NFW (tratada con DEPC). Para visualizar la calidad de la extracción se mezcló 2  $\mu\text{L}$  del RNA extraído con 10  $\mu\text{L}$  de una solución que contiene formamida y se incubó a 65°C durante 15 min cargándose en un gel de agarosa al 2% en *buffer* TBE para su posterior visualización en un transiluminador.

#### 4.2.3 Reacción de transcripción reversa (RT-PCR)

Para la síntesis de cDNA se utilizó como templado el RNA extraído anteriormente y la enzima de transcripción reversa MMLV de acuerdo a las recomendaciones especificadas por la compañía Promega®: Se incubó 2  $\mu\text{g}$  de RNA, 0.5  $\mu\text{g}$  de *primer* FMV 10820 (Tabla 3) por microgramo de RNA en un volumen menor de 15  $\mu\text{L}$  a 70°C durante 5 minutos, inmediatamente



después fue incubada la mezcla a 4°C por 5 minutos. En ese lapso, se añadió 5 µL de *buffer* de reacción M-MLV5X (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM DTT), 1.25 µL dNTPs 10mM, 25 unidades de RNAsin, y agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 24 µL. Se incubó a 42°C durante 2 minutos y luego se agregó 200U de M-MLV RT. Se mezcló y finalmente incubó a 42°C durante 50 minutos. La reacción fue detenida inactivando la enzima a 70°C durante 5 minutos. El *primer* FMV10820 correspondió a los últimos 20 nucleótidos de todos los potyvirus que infectan al camote (Tairo *et al.*, 2005).

#### 4.2.4 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

En la posterior reacción de amplificación mediante PCR se esperó un fragmento de aproximadamente 1.8 Kb del genoma del potyvirus que incluye parcialmente la proteína NIb, la región completa de la cápside proteica y la región 3'UTR que no se traduce. La amplificación se llevó a cabo utilizando el set de *primers* específicos para potyvirus PVD-2 (F ó sentido) (Gibbs y Mackenzie, 1997) y el *primer* FMV 10820 (R ó antisentido) (Tairo *et al.*, 2005). La reacción fue llevada a cabo en 25 µL con los siguientes componentes: 1X Buffer PCR (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9.0), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM de cada dGTP, dATP, dTTP, y dCTP, 0.3 µM de cada *primer*, 1 U of *Taq* DNA polimerasa (CIP), y 2.5 µL del producto de reacción de transcripción reversa. El programa del PCR fue el siguiente: 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 15 s, 52°C por 20 s y 72°C por 1.5 min, y luego una elongación final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1% en *buffer* TBE y los fragmentos de interés recuperados utilizando el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega®) según las especificaciones de la compañía.

#### 4.2.5 Clonamiento de los fragmentos de PCR

El DNA recuperado fue ligado en el vector plasmídico pCR 2.1 (Invitrogen®) (Figura 3). Según las especificaciones de la compañía se mezcló 5 µL de NFW, 1 µL de Buffer 10X de Ligación (60 mM Tris-HCl, pH

**Tabla 3.** Secuencias de los *primers* utilizados en las reacciones de RT-PCR, PCR, clonamiento y secuenciamiento total de la región de interés en aislamientos peruanos de SPFMV

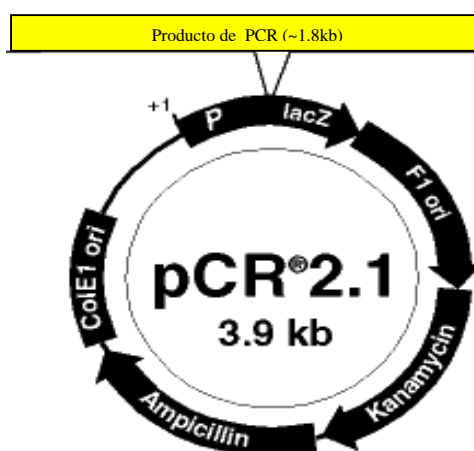
<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>	<i>T. de melting</i>	<i>Función</i>
FMV10820	GGCTCGATCACGAACCAAAA	51.4	RT-PCR, PCR
PVD-2	GGBAAYAAYAGYGGDCARCC	52.6	PCR
FMV 9675 F	AGATGCIGGWGCRACCCWCCAG	64.6	secuenciamiento
FMV 9675 R	CTGGWGGGTYYGCWCCNGCATCT	64.6	secuenciamiento
FMV 10244 F	CATGCAGTGCCTACTTTTAGGC	53.5	secuenciamiento
FMV 10244 R	GCCTAAAAGTAGGCACTGCATG	53.5	secuenciamiento

7.5, 60 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, 70 mM β-mercaptoetanol, 1 mM ATP, 20 mM ditiotretitol y 10 mM de espermidina), 2 µL del vector pCR®2.1 (25 ng/µL) y 1 µL de T4 DNA ligasa (4 unidades Weiss/µL), se incubó la mezcla a 14°C durante toda la noche. El plásmido cuenta con dos sitios de restricción *EcoRI* para la comprobación de la inserción del fragmento clonado (Figura 3). El fragmento ligado luego fue introducido en la bacteria *E. coli* DH5α mediante transformación con un cambio brusco de temperatura según los siguientes pasos: el producto de la ligación fue mezclado e incubado a 4°C con 100 µL de cultivo bacteriano durante 30 min, luego fue incubada la mezcla durante 1 min a 42°C y rápidamente se volvió a incubar a 4°C durante 5 min. Seguidamente, se agregó caldo LB enriquecido con glucosa y se dejó incubando a 37°C durante una hora. En este lapso de tiempo, se preparó placas de cultivo LB agar conteniendo kanamicina 100 ppm, 25 µL de IPTG 100 mM y X-Gal 100 mM cada una. Se plaqueó el cultivo líquido e incubó a 37°C toda la noche. Al día siguiente, se seleccionaron las colonias blancas que era de esperarse contenerían el plásmido más el inserto. y fueron cultivadas en medio LB líquido conteniendo 100 ppm de kanamicina a 37°C toda la noche. La extracción de plásmidos conteniendo el fragmento de interés se realizó utilizando el *Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega®). Se tomó 1 µL de la elución final y se procedió a la digestión con *EcoRI* siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega®) para la

comprobación final del tamaño de fragmento clonado. Se visualizó la acción de la enzima de restricción sobre el plásmido mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en *buffer* TBE.

#### 4.2.6 Secuenciamiento de fragmentos obtenidos

Para el secuenciamiento total del fragmento clonado se utilizaron los *primers* universales M13F y M13R, y además fue necesario diseñar *primers* internos, los cuales se diseñaron manualmente y sus propiedades termodinámicas fueron evaluadas mediante el uso del software *Vector NTI 9.0* (Invitrogen®) (Tabla 3). El secuenciamiento de los plásmidos que contenían el fragmento deseado fue realizado por la compañía *Macrogen* (Korea). Con este fin, se enviaron a secuenciar al menos dos clones individuales por aislamiento y cuando se detectó conflictos se secuenciaron nuevos clones. En el caso de *gaps* inesperados, el fragmento fue reamplificado de una nueva extracción de RNA y re-secuenciado. Los resultados del secuenciamiento fueron obtenidos en archivos con extensión *abi*, *txt*, *phd.1*, y *pdf*, y fueron ensambladas en *contigs* para generar secuencias consensos utilizando el programa *Seqman*, que estuvo incluido en el paquete de programa *DNASTAR* (DNASTAR Inc., USA).



**Figura 3.** Representación del plásmido vector pCR2.1 (Invitrogen®) conteniendo el producto de PCR (1.8kb) amplificado en el presente estudio.

#### 4.2.7 Análisis de secuencias

Las secuencias nucleotídicas de cada aislamiento, fueron obtenidas del consenso generado al ensamblar 6 secuencias (3 en sentido y 3 en anti-sentido) obtenidas de igual número de reacciones de secuenciamiento utilizando los *primers* M13F, M13R y los cuatro *primers* internos diseñados (Tabla 3). La presencia de conflictos fue observada en cada cromatograma. Dichas secuencias consenso para cada aislamiento fueron alineadas con otras tomadas del banco de secuencias NCBI (Tabla 4) utilizando el algoritmo *CLUSTAL W* del programa *MEGA 4.0* (Kumar *et al.*, 2004). Para efectos de los análisis se utilizó la región que comprendía la totalidad del gen de la cápside proteica viral, la totalidad de la región 3'UTR, así como la región 5'-terminal de la replicasa NIb (aproximadamente 624 nucleótidos). Se comprobó visualmente la ocurrencia de *gaps* o deleciones. Las distancias evolutivas entre las secuencias en estudio fueron obtenidas utilizando distancias estandarizadas *p-distance* del programa *MEGA 4.0* (Kumar *et al.*, 2004). Esto permite calcular las distancias comparando la proporción ( $p$ ) de sitios nucleotídicos y es obtenido dividiendo el número de diferencias nucleotídicas entre el número de nucleótidos totales comparados sin tomar en cuenta ninguna corrección como sustituciones múltiples en el mismo sitio, diferencias en el tipo de sustitución o diferencias en las tasas de evolución de los diferentes sitios. Asimismo, con la ayuda del programa DAMBE (Xia y Xie, 2001), los alineamientos obtenidos fueron sometidos a pruebas de saturación de sustituciones nucleotídicas mediante ploteos de la tasas de tranversiones y transiciones de los tres nucleótidos de cada codón con las distancias genéticas con el fin de verificar si las señales filogenéticas de estos alineamientos eran genuinas.

#### 4.2.8 Reconstrucciones Filogenéticas

Las relaciones filogenéticas entre las secuencias obtenidas de los aislamientos peruanos y otros aislamientos de SPFMV u otros virus relacionados fueron establecidas mediante la reconstrucción de árboles filogenéticos utilizando los modelos de sustitución nucleotídica que mejor se

adecuaron para cada alineamiento. Para determinar la elección de dichos modelos se utilizó el programa jMODELTEST (Posada, 2008) el cual presenta 88 modelos tentativos los que se valoraron utilizando el criterio bayessiano (BIC). El método de reconstrucción utilizado fue el de *Neighbor-Joining*. Tanto el método de reconstrucción filogenética como los modelos de sustitución nucleotídica elegidos se encontraron disponibles en el programa DAMBE. La confiabilidad de los árboles fue evaluada mediante pruebas de *bootstrap* de 1000 repeticiones en todos los casos.

#### **4.2.9 Análisis de recombinación**

Algunos eventos de recombinación fueron observados luego de un examen visual muy cuidadoso de los alineamientos múltiples de las secuencias nucleotídicas. Para confirmar la ocurrencia de los eventos de recombinación se usó el programa RDP (*Recombination Detection Program*, Martin *et al.*, 2005). Para una confirmación aún mayor, los alineamientos múltiples de secuencias fueron cortados en los puntos de recombinación predecidos por el RDP y se realizó el análisis filogenético de las mismas secuencias que correspondían a cada lado del punto de recombinación, utilizando los mismos parámetros arriba descritos. Aquellos virus que fueron agrupados en diferentes cepas con un valor de *bootstrap* mayor a 90% en diferentes árboles filogenéticos, fueron considerados verdaderos recombinantes.

#### **4.2.9 Análisis de secuencias con otros potyvirus**

Secuencias adicionales de las regiones de cubierta proteica de 51 potyvirus (Anexo I) fueron analizadas junto a los de SPFMV, SPVG y SPV2, con el fin de establecer las relaciones filogenéticas dentro de este género. Los análisis de filogenia se realizaron del mismo modo en que fueron descritos previamente.

**Tabla 4.** Número de accesoión de las secuencias que comprenden la región 3'- terminal de la proteína N1b, la cubierta proteica y la región 3'UTR del genoma de SPFMV, así como secuencias sólo de la cubierta proteica del mismo virus obtenidas del banco de datos NCBI y que fueron utilizadas en el análisis bioinformático del presente estudio.

Aislamiento	Origen	Cepa	Número de accesoión	Referencia
25-4aCP	Kenya	C	AY523543	Ateka <i>et al</i> no publicado
51-9S	Kenya	C	AY459591	Ateka <i>et al</i> no publicado
54-9S	Kenya	EA	AY459592	Ateka <i>et al</i> no publicado
85-7S	Kenya	EA	AY459593	Ateka <i>et al</i> no publicado
115-1SCP	Kenya	O	AY523538S3	Ateka <i>et al</i> no publicado
46bCP	Kenya	EA	AY523548	Ateka <i>et al</i> no publicado
Apa	Uganda	EA	AJ781787	Tairo <i>et al</i> , 2005
Aus2	Australia	RC	AJ781775	Tairo <i>et al</i> , 2005
Aus4c	Australia	C	AJ781778	Tairo <i>et al</i> , 2005
Aus5RC	Australia	RC	AJ781776	Tairo <i>et al</i> , 2005
Aus5c	Australia	C	AJ781779	Tairo <i>et al</i> , 2005
Aus6	Australia	RC	AJ781777	Tairo <i>et al</i> , 2005
Bag	Tanzania	EA	AJ781780	Tairo <i>et al</i> , 2005
Bkb 1	Tanzania	EA	AJ781781	Tairo <i>et al</i> , 2005
Bkb2	Tanzania	EA	AJ781782	Tairo <i>et al</i> , 2005
C	USA	C	S43450	Abad <i>et al</i> 1992
Canar3	Spain	EA	AY459600	Ateka <i>et al</i> no publicado
Eg1	Egypt	RC	AJ515378	Ishak <i>et al</i> , 2003
Eg9	Egypt	RC	AJ515379	Ishak <i>et al</i> , 2003
Kby 1	Uganda	EA	AJ781791	Tairo <i>et al</i> , 2005
Kby 2	Uganda	EA	AJ781792	Tairo <i>et al</i> , 2005
Mbl2	Uganda	EA	AJ781788	Tairo <i>et al</i> , 2005
Mis1	Tanzania	EA	AJ781783	Tairo <i>et al</i> , 2005
Nak	Uganda	EA	AJ781790	Tairo <i>et al</i> , 2005
Nam 12	Uganda	C	AY459596	Ateka <i>et al</i> no publicado
Mpg2	Uganda	EA	AJ781789	Tairo <i>et al</i> , 2005
O	Japan	O	D16664	Mori <i>et al</i> , 1994
Rak6e	Uganda	EA	AJ010706	Ateka <i>et al</i> no publicado
Tar1	Tanzania	EA	AJ781784	Tairo <i>et al</i> , 2005
Tar2	Tanzania	EA	AJ781785	Tairo <i>et al</i> , 2005
TZ4	Tanzania	O	AY459598	Ateka <i>et al</i> no publicado
SPFMV Bny	Uganda	EA	AJ539130	Mukasa <i>et al</i> , 2003
SPFMV S	Japan	RC	D86371	Sakai <i>et al</i> , 1997
SPFMV SOR	Uganda	C	AJ539129	Mukasa <i>et al</i> , 2003
SPFMV Tz1	Tanzania	EA	AJ539131	Mukasa <i>et al</i> 2003
SPFMV Tz2	Tanzania	EA	AJ539132	Mukasa <i>et al</i> 2003
Strain 5	Argentina	O	SPU96624	Alvarez <i>et al</i> no publicado
Unj1	Tanzania	EA	AJ781786	Tairo <i>et al</i> , 2005
Zam 1	Zambia	EA	AY523552S4	Ateka <i>et al</i> no publicado

## V. RESULTADOS

### 5.1 Colecta de muestras

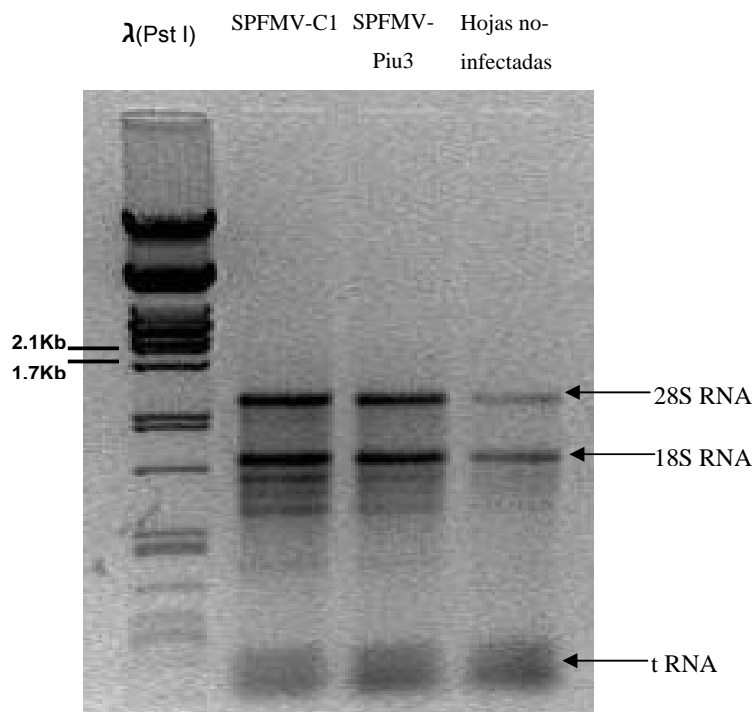
Se obtuvieron 21 muestras de camote procedentes de las principales zonas de cultivo del Perú. De éstas el mayor número procedió de la localidad de Cañete, ya que es la mayor zona productora de camote (Tabla 5).

### 5.2 Extracción de ARN total

El método que utiliza el reactivo TRIZOL (Invitrogen®) resultó muy efectivo para la extracción de RNA a partir de hojas de camote que mostraban síntomas de infección viral. La figura 4, muestra los resultados de calidad de RNA totales luego de correr 5 µL del resuspendido final de la extracción en un gel de agarosa 1%. La concentración de ácido nucleico obtenido estuvo entre 1.3 – 1.5 µg/µL.

**Tabla 5.** Muestras procesadas y aislamientos secuenciados en este estudio y recolectadas según las diferentes zonas productoras de camote del Perú recolectados

Localidad	No muestras colectadas	No de aislamientos PCR positivos	Denominación de los aislamientos secuenciados
Cañete	9	9	M2-44, M2-41, M2-63, C21, C18, C-14, C1, KmtFio, KmtMil3
Ferreñafe	2	1	Fe
Chimbote	3	2	Ch2, Ch4
Piura	3	1	Piu3
San Ramón	2	1	SR2
Huaral	3	3	Hua2, Hua3, SP33

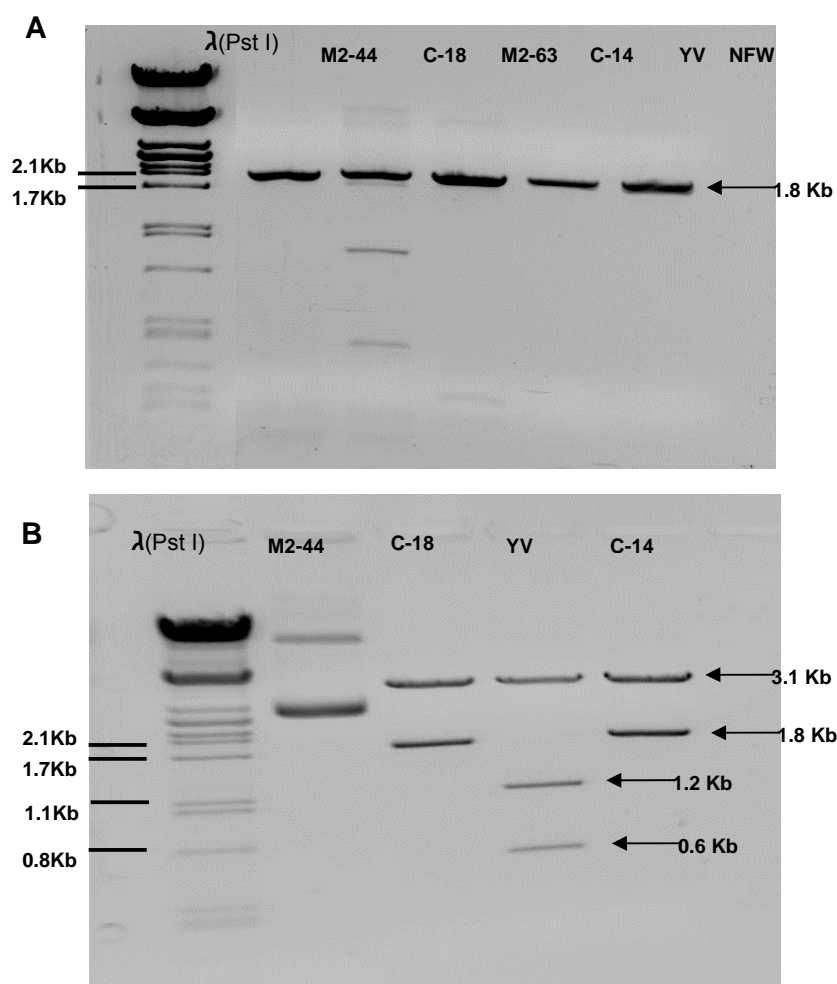


**Figura 4.** Extracciones de RNA total separadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Estas fueron obtenidas mediante el método de Trizol a partir de muestras de tejido vegetal (2μL de resuspendido final) de hojas infectadas con SPFMV C1 y SPFMV Piu3 y el control no-infectado. λ(Pst I): marcador fago λ digerido con la enzima de restricción *Pst* I

### 5.3 Amplificación y clonamiento del fragmento de interés

En este estudio se determinaron las secuencias nucleotídicas que comprende la región 3'-terminal del gen que codifica la replicasa (NIb), el gen que codifica la cápside proteica (CP) y la región 3'UTR de 16 aislamientos de SPFMV: 15 peruanos y un estadounidense (YV), así como de un aislamiento del virus SPV2 y otro del SPVG. En la figura 5A, se muestra los fragmentos de tamaño esperado de ~1.8Kb de algunos aislamientos obtenidos mediante el uso de los *primers* PVD-2 y FMV10820, y las condiciones de PCR descritas anteriormente. En la figura 5B se muestra el clonamiento exitoso del fragmento que comprende la región 3'terminiinal del SPFMV en el plásmido vector pCR 2.1, siendo de un particular interés que únicamente el aislamiento YV presente un sitio de restricción *Eco*RI a lo largo del fragmento clonado.





**Figura 5.** Productos de reacciones de PCR (A) y digestiones enzimáticas (B) separadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. A) Los fragmentos amplificados por PCR contienen la región 3'-terminal del gen de la proteína Nib, el gen de la CP y la región 3'UTR del genoma viral de aislamientos peruanos de SPFMV (M2-44, C-18, M2-63, C-14, y YV) y tienen el peso molecular esperado (~1.8kb). B) Fragmentos que resultan de la digestión con *EcoRI* de plásmidos pCR2.1 que fueron ligados previamente a los amplicones descritos en A.

#### 5.4 Análisis de secuencias de SPFMV

Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas a partir de éstas, fueron depositadas en el banco de genes Genbank y sus respectivos números de acceso figuran en la Tabla 6. La secuencia deducida de la proteína de cubierta de la mayoría de aislamientos fue de 315 aminoácidos de longitud, de los cuales 155 mostraron variabilidad (36.5%), 60 de los

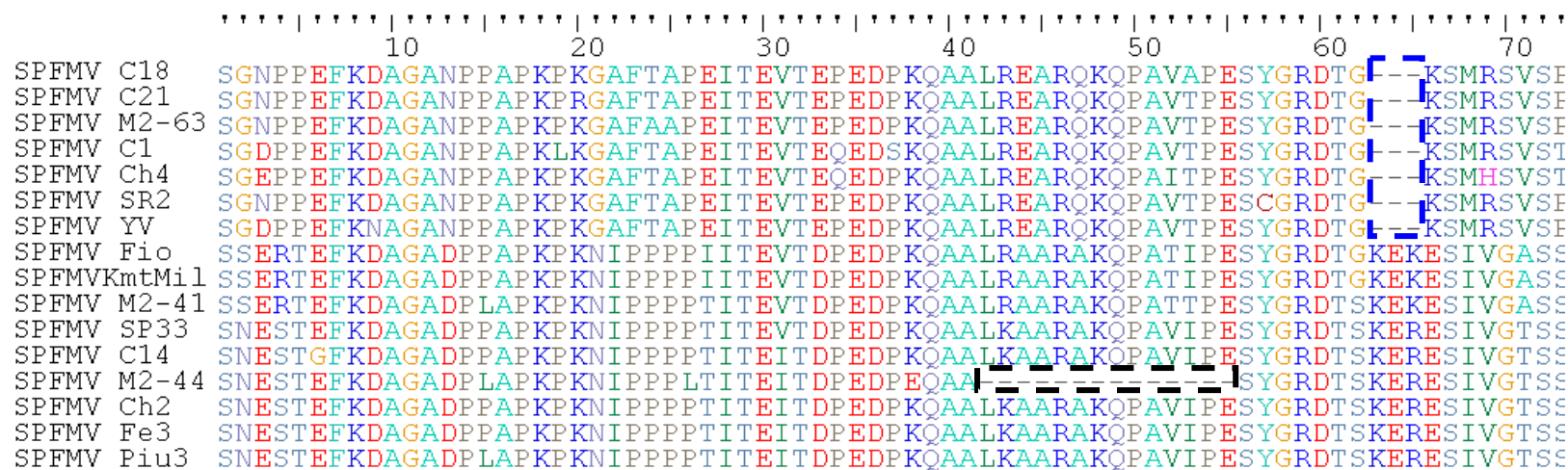
mismos se localizaron en la región N-terminal. El aminoácido de inicio de la secuencia de la proteína de cubierta es el mismo tanto en los aislamientos obtenidos en este estudio como en los reportados anteriormente (Serina); asimismo, se puede observar la presencia del motivo de aminoácidos DAG (posiciones 9 a 11) necesarios para la transmisión de los potyvirus mediante áfidos (Figura 6). Por otro lado, todos los aislamientos peruanos que pertenecen a la cepa C, presentan una delección de dos aminoácidos en las posiciones 62 y 63 (Figura 6), similar observación también fue reportada por Tairo *et al.*, 2005 en otros aislamientos de esta cepa. Adicionalmente, el aislamiento M2-44 presenta una delección adicional de 14 aminoácidos detectada en la región 5'-terminal del gen de la CP a la altura de las posiciones aminoacídicas 42-55 (Figura 6).

**Tabla 6.** Número de accesión de las secuencias nucleotídicas que fueron depositadas en el Genbank de los aislamientos de SPFMV peruanos, americanos y otros potyvirus

<b>Aislamiento</b>	<b>Cepa</b>	<b>No Accesión</b>
SPFMV YV	C	EU021058
SPFMV Fe	EA	EU021070
SPFMV C14	EA	EU021071
SPFMV Ch2	EA	EU021067
SPFMV M2-44	EA	EU021069
SPFMV Piu3	EA	EU021072
SPFMV SP33	EA	EU021068
SPFMV Kmt Fio	RC	EU021065
SPFMV KmtMil3	RC	EU021066
SPFMV M2-41	RC	EU021064
SPFMV C1	C	EU021057
SPFMV Ch4	C	EU021062
SPFMV C18	C	EU021059
SPFMV M2-63	C	EU021060
SPFMV C21	C	EU021061
SPFMV SR 2	C	EU021063
SPVG Hua2	-	EU218528
SPV2 Hua3	-	EU218529

## 5.5 Análisis de identidad genética y reconstrucción filogenética

Para el análisis bioinformático de SPFMV en este estudio, se incluyeron además de las secuencias determinadas en este estudio, otras 39 provenientes del banco de genes del Genbank (Tabla 4). Los resultados de los análisis de identidad se muestran en la Figura 7. Los valores medios de identidad en el análisis de distancia filogenética que se muestran, resultaron ser menores para la variante C con respecto a las otras variantes. Esto se da tanto en el análisis de nucleótidos como de aminoácidos, situación que coincide con lo antes reportado para este virus y que sitúa a esta variante más alejada filogenéticamente de las demás (Kreuze *et al.*, 2000; Mukasa *et al.*, 2003a; Tairo *et al.*, 2005). La variación intergrupala para el caso de la CP y la región 3'-terminal de la NIb se encuentra en los límites establecidos por la taxonomía molecular de potyvirus para la discriminación de especies; en tanto que, las de la región 3'UTR quedan muy por encima de los valores límites. Los valores de identidad intergrupala de la región N-terminal de la CP se muestran menores que los de la CP completa, confirmando que esta región es la más variable al interior de esta proteína. Los valores intragrupales, determinan que no existe gran variabilidad dentro de cada cepa. Las pruebas de evaluación de saturación de éstas secuencias, muestran que estas tienen cierto nivel de saturación cuando son analizadas todas las posiciones de los codones en conjunto (Anexo 1). El modelo utilizado fue el de Tamura y Nei (1993) (TrN+G) (Tamura y Nei, 1993) y Nei, 1993) cuyo valor Gamma resultó en 0.3740 (Anexo4). El árbol filogenético NJ resultante (Figura 8) muestra que según el modelo utilizado, los aislamientos analizados están divididos en las cuatro variantes previamente reportadas, con valores de *bootstrap* (valores estadístico que estiman el nivel de confianza de una relación filogenética inferida) mayores a 70%. Asimismo, se observa que en el Perú existen tres de las cuatro cepas de SPFMV: EA, RC y C. Este es el primer reporte de un aislamiento de la cepa EA en el continente americano y unos de los primeros fuera de este continente.



**Figura 6.** Alineamiento múltiple de secuencias de la proteína de cubierta de diferentes aislamientos de SPFMV utilizado el algoritmo CLUSTAL W. A pesar de la variabilidad presente, todos empiezan con el aminoácido Serina, se observa también el triplete conservado DAG necesario para la transmisión del virus a través de áfidos (línea roja). Asimismo, se muestra un *gap* de 3 aminoácidos observado en una región de alta variabilidad ubicada en todos los aislamientos peruanos de la variante C. El recuadro negro, muestra un *gap* de 13 aminoácidos en la secuencia del aislamiento peruano M2-44.

**a. Nlb C-term (208 aa)**

	C	RC	O	EA
C	93.2 ± 0.6 <b>95.9 ±</b>			
RC	75.9 ± 1.7 <b>85.3 ± 2.2</b>	98.4 ± 0.3 <b>98.9 ± 0.4</b>		
O	75.5 ± 1.7 <b>84 ± 2.2</b>	87.5 ± 1.3 <b>92.3 ± 1.6</b>	95.4 ± 0.9 <b>96.6 ± 1.3</b>	
EA	75.3 ± 1.7 <b>84.5 ± 2.2</b>	87.5 ± 1.3 <b>92.9 ± 1.5</b>	88.5 ± 1.2 <b>94.2 ± 1.4</b>	96.5 ± 0.3 <b>98.3 ± 0.3</b>

**b. CP**

	C	RC	O	EA
C	96.1 ± 0.3 <b>96.4 ± 0.5</b>			
RC	77.5 ± 1.1 <b>83.3 ± 1.9</b>	98.5 ± 0.2 <b>98.5 ± 0.4</b>		
O	76.7 ± 1.1 <b>81.2 ± 1.9</b>	91 ± 0.7 <b>95.1 ± 0.9</b>	95.4 ± 0.3 <b>96.2 ± 0.6</b>	
EA	77.6 ± 1.1 <b>82.5 ± 1.9</b>	93.2 ± 0.6 <b>96 ± 0.8</b>	92.3 ± 0.7 <b>94.8 ± 0.9</b>	96.4 ± 0.3 <b>97.1 ± 0.5</b>

**c. CP N-term**

	C	RC	O	EA
C	93.9 ± 0.8 <b>91.8 ± 1.5</b>			
RC	62.5 ± 2.9 <b>63.3 ± 5.1</b>	97 ± 0.6 <b>95.4 ± 1.4</b>		
O	59.1 ± 3 <b>57.3 ± 5.2</b>	83.6 ± 2 <b>86.1 ± 3</b>	93.5 ± 0.8 <b>92.1 ± 1.7</b>	
EA	60.5 ± 2.9 <b>61.3 ± 5.1</b>	87.6 ± 1.8 <b>87 ± 2.8</b>	86.2 ± 1.6 <b>85.4 ± 3</b>	94.3 ± 0.7 <b>92.1 ± 1.7</b>

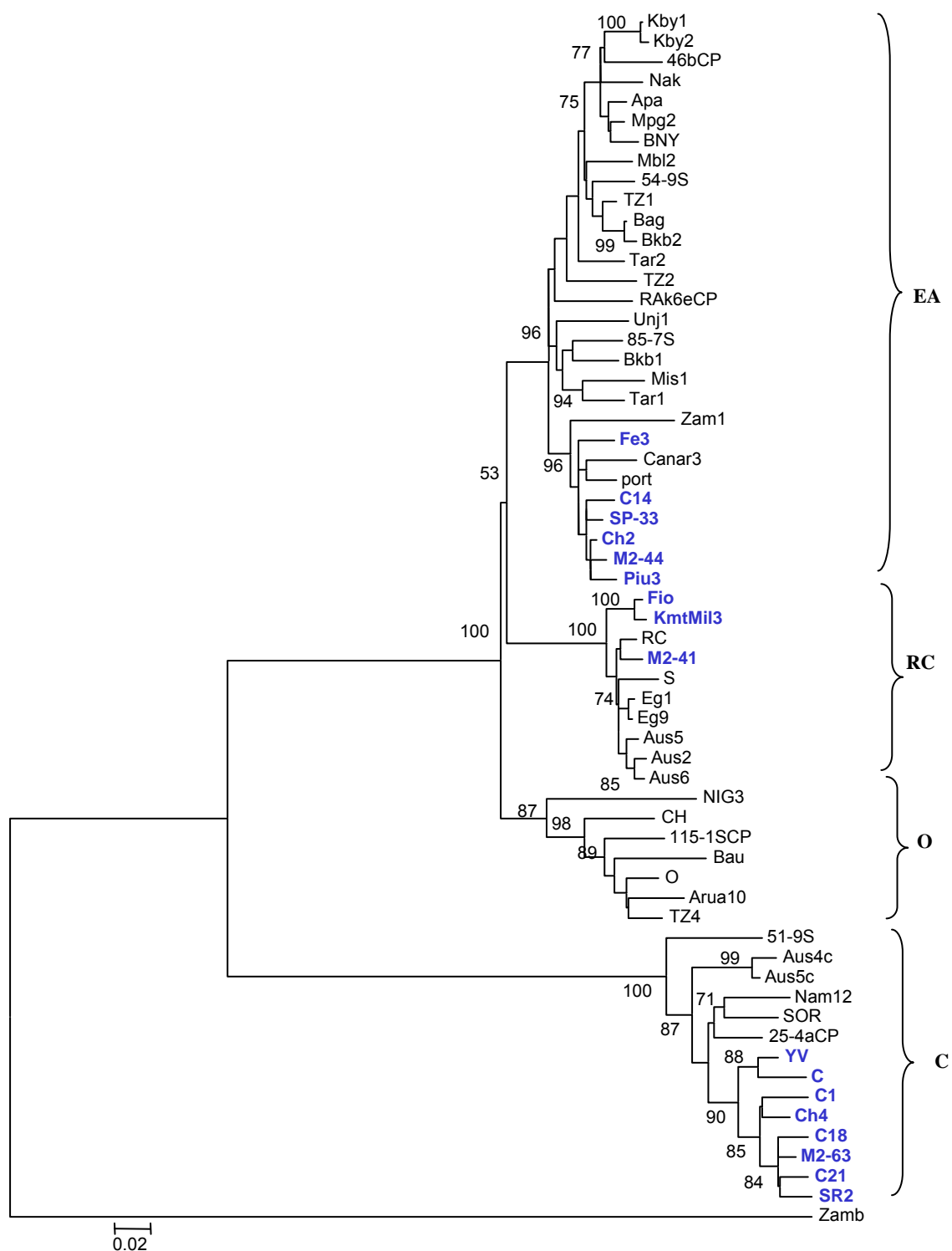
**d. 3' UTR**

	C	RC	O	EA
C	96.7 ± 0.7			
RC	83.1 ± 2.3	99 ± 0.3		
O	82.3 ± 2.3	97 ± 0.7	96.7 ± 0.7	
EA	82.3 ± 2.3	98 ± 0.5	97.4 ± 0.5	98.1 ± 0.4

**Figure 7.** Porcentajes de identidad nucleotídica y aminoacídica (**en negrita**) inter e intragrupal, calculados para los últimos 208 aminoácidos de la región C-terminal de la proteína Nlb (a), la proteína de cubierta (b), la región hipervariable N-terminal de la CP (c) y la región 3'UTR (d).

## 5.6 Análisis de recombinación

La inspección visual de los alineamientos múltiples de los fragmentos completos de ~1800 nt sugirió que algunos de los aislamientos de SPFMV podrían ser el resultado de eventos de recombinación entre aislamientos que pertenecen a distintas cepas. Así, por ejemplo, en los aislamientos C y YV, la región 5'-terminal que codifica a la CP y la región 3'UTR parecen derivar de un aislamiento de la cepa C y otra cepa no identificada, respectivamente (Figura 9). De manera similar, en los aislamientos egipcios Eg1 y Eg9, la región central del gen Nlb y el resto de la región 3'-terminal del mismo gen, parecen haber sido originados de aislamientos de las cepas EA y RC, respectivamente (Figura 10).

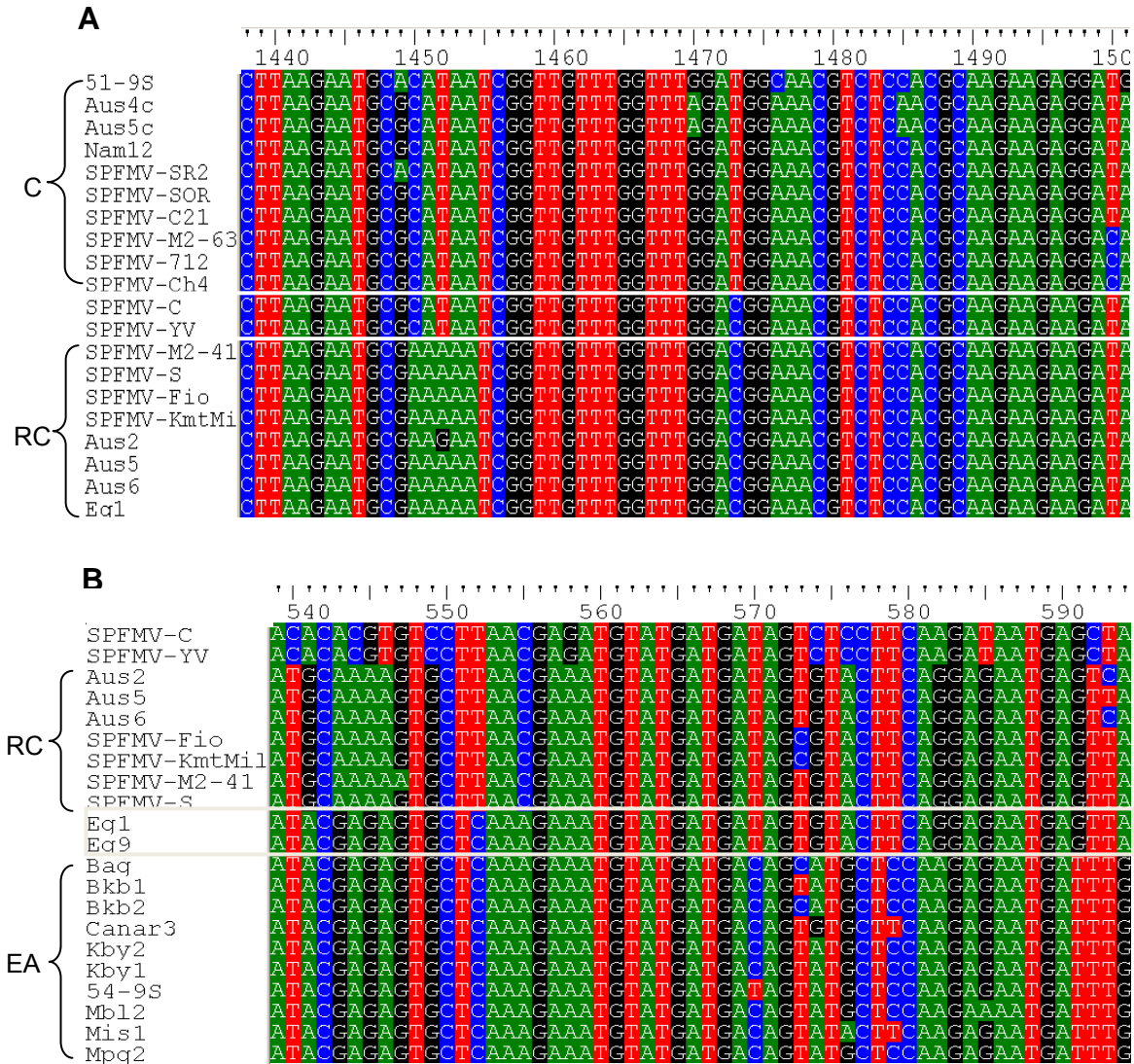


**Figura 8.** Árbol filogenético NJ de aislamientos de SPFMV, construido en base al modelo Tamura-Nei inferido de los alineamientos de secuencias nucleotídicas que codifican la proteína de cubierta de diferentes aislamientos de SPFMV, incluyendo los peruanos (en azul). La barra muestra 0.02 sustituciones nucleotídicas por sitio. El árbol fue sometido a análisis de *bootstrap* con 1000 repeticiones para evaluar su confiabilidad. Se utilizó el aislamiento Zam de SPV2 como outgroup.

Para confirmar estas hipótesis se realizaron análisis de recombinación utilizando las secuencias alineadas previamente y se aplicaron varios algoritmos que fueron proporcionados por el programa RDP 2.0. Estos algoritmos predijeron con alta probabilidad la ocurrencia de eventos de recombinación en los aislamientos arriba descritos. Por ejemplo, el algoritmo *Max-Chi Squared* (Maynard-Smith, 1992) predijo los puntos de recombinación en las posiciones que se muestran en las figuras 9 y 10, y que tuvieron concordancia con los visualizados anteriormente. El primero de ellos fue localizado en la posición 570 de nuestro fragmento ( $Av P_{value} = 2.448 \times 10^{-10}$ ) que correspondió a la posición 9597, de la secuencia nucleotídica completa del aislamiento S usada como referencia (Sakai *et al.*, 1997); este punto está dentro de la región 3'-terminal del gen Nlb, y es compartido por los aislamientos egipcios Eg1 y Eg9; en tanto que el segundo punto de recombinación está localizado en la posición 1473 de nuestro fragmento ( $Av P_{value} = 9.517 \times 10^{-9}$ ) que correspondió a la posición 10500 del aislamiento S y que se encuentra localizado en la región 3'-terminal de la CP de los aislamientos C y YV.

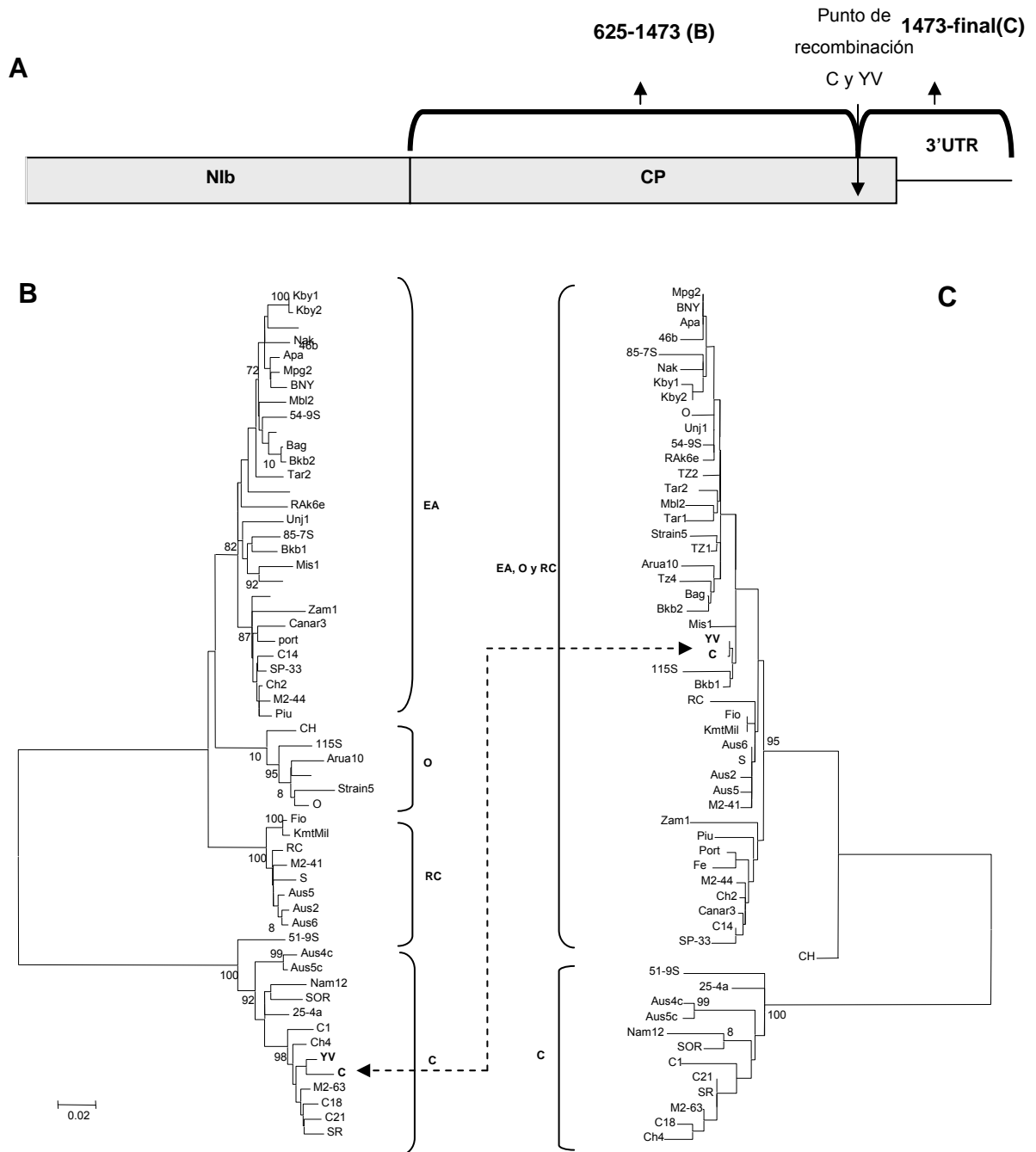
La confirmación final de la ocurrencia de recombinación en estos aislamientos se obtuvo mediante la reconstrucción de árboles filogenéticos de las regiones que comprendieron ambos lados de los puntos de recombinación predecidos (Figuras 9A y 10A). La topología de los tres árboles fueron similares, distinguiéndose a las cuatro cepas, con la excepción del árbol reconstruido a partir del segmento que comprende desde la posición 1473 hasta el final del 3'UTR (Figura 9C), en el cual sólo dos *clados* están bien definidos por los valores de *bootstrap*, uno que contiene los aislamientos de la cepa C (Figura 9B) y el otro a las demás cepas (Figura 9C). Las diferencias topológicas en la ubicación de los aislamientos egipcios entre los árboles producidos usando diferentes regiones genómicas confirman claramente que ambos aislamientos son miembros de la cepa EA cuando el alineamiento de la región que comprende las posiciones 0-530 del fragmento en estudio es analizado, mientras que son miembros de la cepa RC cuando el análisis se realiza desde la posición 531 hasta el final del 3'UTR. De manera similar, los aislamientos C y YV

pertenecen a la cepa C cuando se analiza la región que comprende a las posiciones 0-1473 (Figura 10B), pero son agrupadas en el mismo *cluster* con los aislamientos de las cepas RC, EA y O cuando se analiza desde la posición 1473 hasta el final del 3'UTR (Figura 10C).

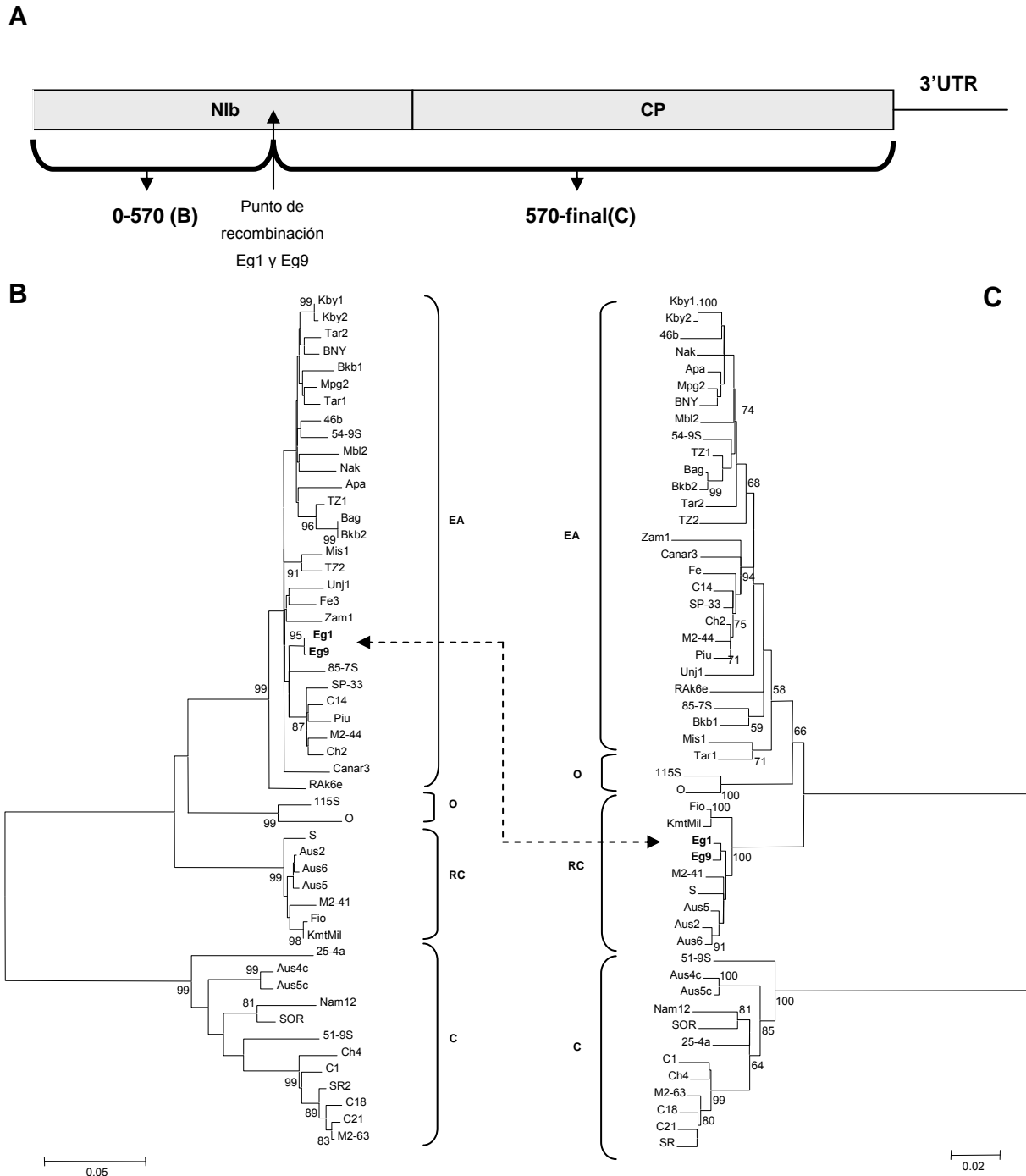


**Figura 9.** Regiones genómicas en las que se visualizaron posibles eventos de recombinación luego de realizar el alineamiento múltiple de secuencias de aislamientos de SPFMV. En (A), los aislamientos YV y C alinean con aislamientos del grupo C antes de la posición 1473, en tanto lo hacen con los aislamientos RC desde del mencionado punto; mientras que en (B) los aislamientos Eg1 y Eg9 alinean con aislamientos del grupo EA antes de la posición 570, en tanto lo hacen con los aislamientos RC desde del mencionado punto.





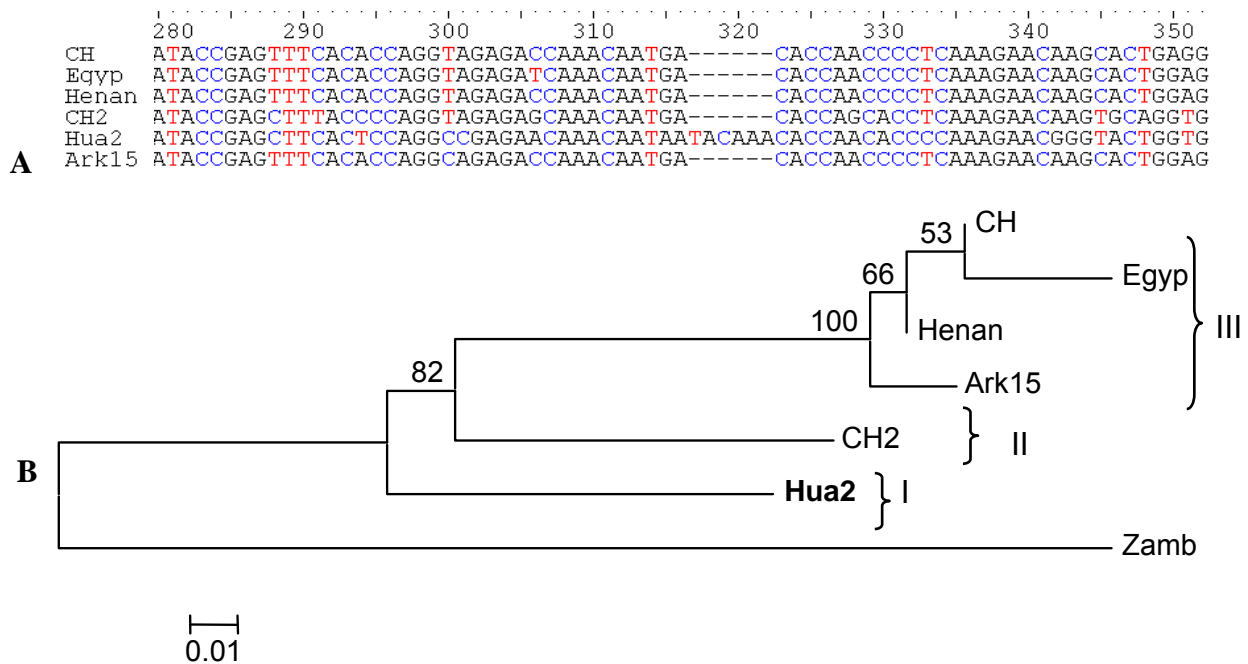
**Figura 10.** Detección de los aislamientos recombinantes C y YV. A) Ubicación del punto de recombinación en estos aislamientos detectado mediante el uso del paquete RDP-programa MAXCHI y que se localiza en la región C-terminal de la CP. **B y C** Árboles filogenéticos reconstruidos a partir de las regiones determinadas en A, se observa incongruencia en la topología de ambos árboles.



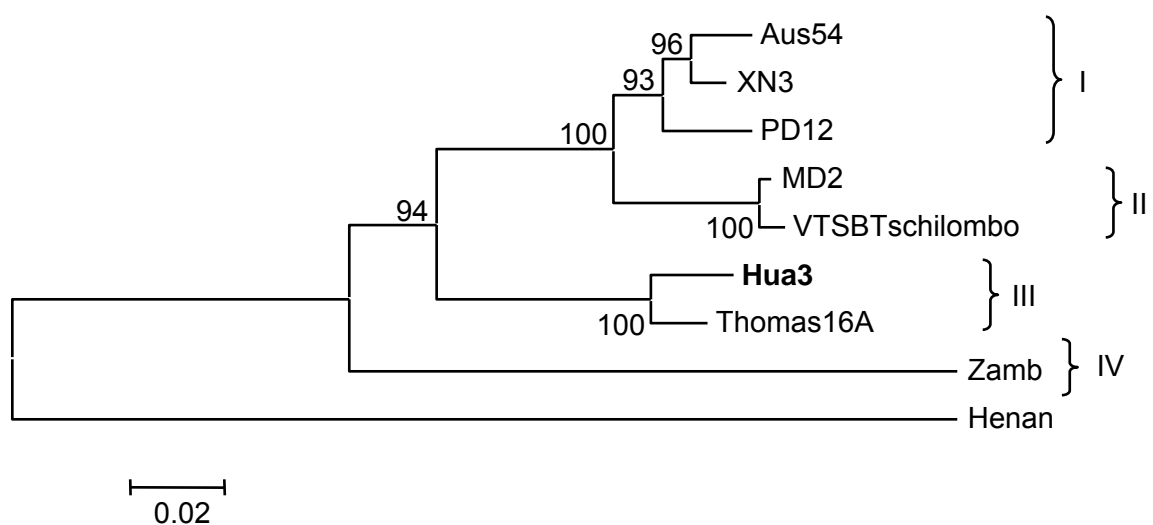
**Figura 11.** Detección de los aislamientos recombinantes Eg1 y Eg9. A) Ubicación del punto de recombinación en estos aislamientos detectado mediante el uso del paquete RDP-programa MAXCHI y que se localiza en la región C-terminal de la proteína Nib. En **B** y **C** se muestran los árboles filogenéticos reconstruidos a partir de las regiones determinadas en **A**, no se observa incongruencia en la topología de ambos árboles; sin embargo el agrupamiento de los aislamientos Eg1 y Eg9 difiere en ambos.

## 5.7 Análisis de las secuencias SPV2 y SPVG

Una búsqueda mediante BLASTn de secuencias de los aislamientos Hua 2 y Hua 3 que habían sido aislados de plantas que mostraban síntomas de SPVD y que no clasificaban como aislamientos de SPFMV, relacionó a éstas de manera muy cercana a aislamientos de SPVG y SPV2, respectivamente (Tabla 6). Al realizar los alineamientos múltiples respectivos (ver números de acceso en Anexo 8), se detectó una inserción de 6 pb (TACAAA) entre las posiciones 317-322 del gen de la proteína de la cubierta en el aislamiento Hua2 respecto a otros aislamientos de SPVG (Figura 12A). Los análisis de evaluación de saturación nucleotídica, de las cepas de ambos virus mostraron que éstos se encuentran medianamente saturados cuando se analizaron las tres posiciones de los codones en conjunto (Anexo 2). Los resultados del análisis del Model test muestran que el modelo de sustitución nucleotídica que se adecua mejor a las secuencias de ambos virus es el TPM2uf+G (*Three Parameter Model*; Kimura, 1981), con valores gamma de 0.4790 y 0.3740 para SPVG y SPV2, respectivamente. Sin embargo, por su disponibilidad en los programas bioinformáticos se seleccionó el modelo HKY+G (Hasegawa *et al* 1985) o también denominado F84 (Felsenstein, 1984) para ambos virus ya que estuvieron ubicados como segundo y tercer mejor modelo, respectivamente (Anexo 5 y 6). El árbol filogenético NJ resultante para el virus SPVG muestra que el aislamiento Hua 2 no está relacionado a ningún otro aislamiento de este virus y podría representar una nueva cepa de este virus. Así, para el caso de SPVG, nosotros proponemos su división en al menos tres linajes distintos representados por CH2, Hua2 y el resto de aislamientos reportados (Figura 12B). Por otro lado, el aislamiento Hua3 resultó más relacionado a la cepa sudafricana Thomas 16 de SPV2. Al analizar las relaciones filogenéticas de éstos aislamientos se confirmó la existencia de cuatro linajes distintos, hecho que fue sugerido previamente por Ateka *et al.* (2007) (Figura 13).



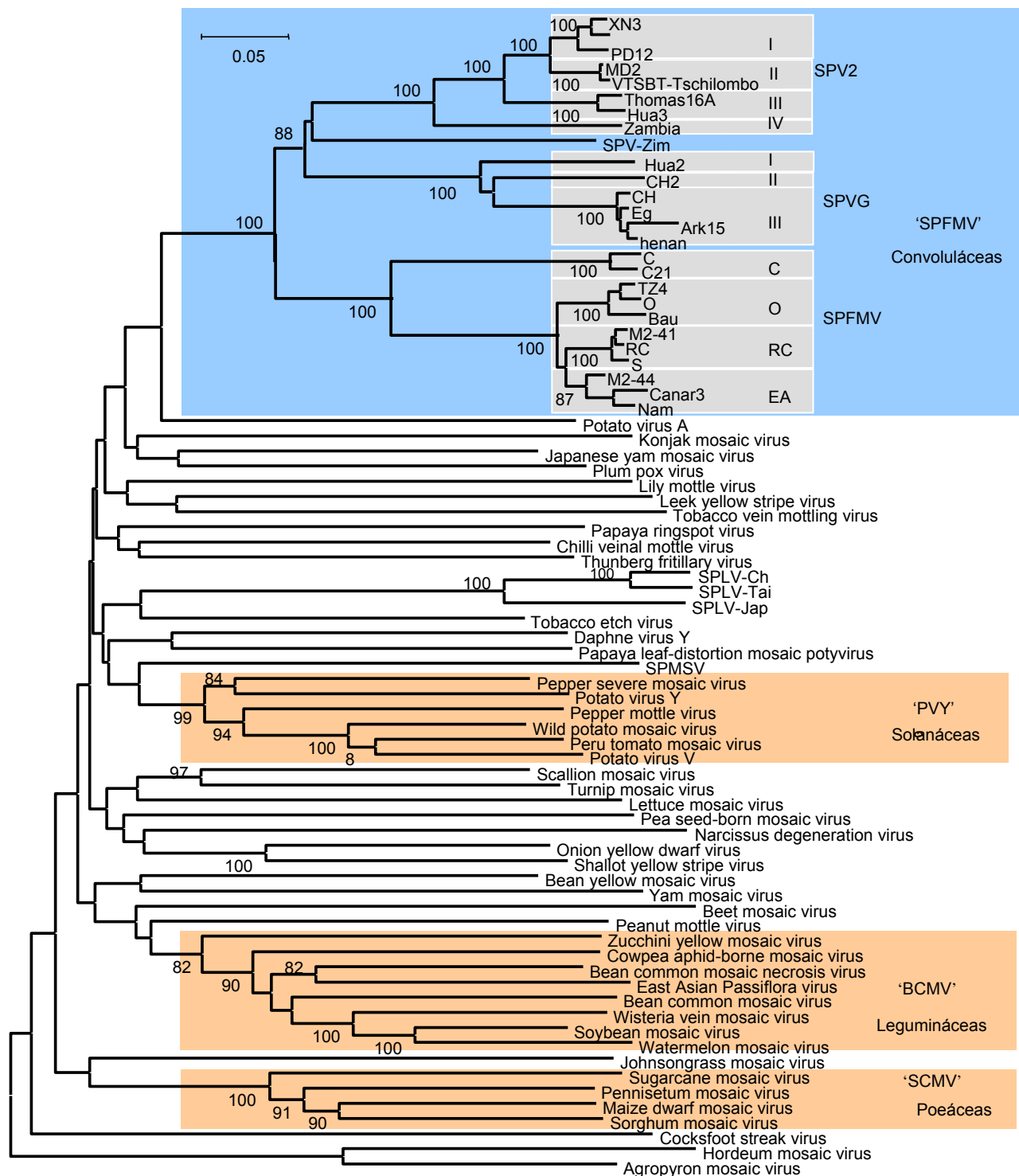
**Figura 12.** Alineamiento múltiple (A) y árbol filogenético Neighbor-Joining (B) generados con las secuencias génicas de la proteína de la cubierta de aislamientos de SPVG, y que incluye a la cepa peruana Hua2. El aislamiento Zamb de SPV2 fue utilizado como secuencia outgroup.



**Figura 13.** Árbol filogenético Neighbor-Joining generado con las secuencias génicas de la proteína de la cubierta de aislamientos de SPV2, y que incluye a la cepa peruana Hua3. El aislamiento Henan de SPVG fue utilizado como secuencia outgroup.

## 5.8 Subgrupo “SPFMV” de potyvirus

El análisis de evaluación de saturación nucleotídica del alineamiento de las secuencias del gen que codifica la cubierta proteica de los potyvirus, muestran cierta saturación (Anexo 3). Adicionalmente, según los resultados del Model test y su disponibilidad en el programa DAMBE, se seleccionó el modelo GTR + G, con un parámetro alfa de 0.558, para las reconstrucciones filogenéticas de estas secuencias (Anexo 7). El modelo GTR asume frecuencias diferentes de las bases nucleotídicas, y diferencias en las tasas de sustitución para cada par de bases (Revers *et al.*, 1996). En el árbol filogenético de *Neighbor Joining* obtenido, se observó que al incluir secuencias adicionales de la región de cubierta proteica de otros potyvirus, tanto SPV2, SPVG, SPFMV y un potyvirus aislado de camote y reportado como SPFMV-Zim, están relacionados, y forman un linaje filogenético separado y con buen soporte de *bootstrap* dentro del género de los potyvirus (Figura 14). Asimismo, se observó que los aislamientos de cada uno de estos virus quedan internamente agrupados en los clados previamente observados en los árboles individuales. Sin embargo, SwPLV y SPMSV, otros dos potyvirus que infectan al camote, no resultan incluidos en este subgrupo de potyvirus, ni tampoco se relacionan entre sí. En caso de SwPLV, éste queda subdividido en los grupos previamente reportados (Colinet *et al.*, 1997). Finalmente, los valores de *bootstrap* señalan el agrupamiento de ciertas especies de potyvirus en linajes filogenéticos previamente reportados por Shukla *et al.* (1994), correspondiendo a los grupos de PVY, BCMV, y SCMV. La figura 14, muestra las familias de plantas hospedadoras a los grupos virales anteriormente mencionados y se encuentran restringidas a las familias *Solanaceae*, *Poaceae* y *Leguminaceae*, respectivamente.



**Figura 14.** Árbol filogenético construido en base a la secuencias nucleotídicas de la proteína de la cubierta de varios potyvirus. El sub-grupo viral “SPFMV” es específico a *Ipomoea*, los otros subgrupos previamente identificados están sombreados en celeste y melón, respectivamente. Los virus que infectan camote están en negrita; mientras que, a excepción del SPFMV, los grupos propuestos en los otros virus se encuentran sombreado en plomo. La barra de escala indica la distancia nucleotídica. Únicamente se muestran los valores de *bootstrap* que soportan ramas con más del 80%. Los números de accesoión del Genbank de cada uno de los virus se indican en las tablas 4 y 6. v el anexo 8.

## VI. DISCUSIÓN

Este estudio es el primer intento de clasificación a nivel molecular de los miembros del género *Potyvirus* que afectan al camote en Perú. Los resultados señalan la presencia de tres de las cuatro principales cepas del virus SPFMV: C, RC y EA, siendo en particular muy interesante haber encontrado miembros de este último grupo por primera vez en campos de cultivo en el continente americano. No se detectó la presencia de la cepa O. Dos de los aislamientos evaluados (C1 y SP-33) fueron colectados en 1987, lo que indica que estos virus han estado presentes en Perú desde antes del gran brote de SPVD ocurrido en 1997 (Gutiérrez *et al.*, 2003). De modo similar, este trabajo se constituye como el primer reporte de los virus SPV2 y SPVG en Sudamérica.

La comparación de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas obtenidas de los aislamientos peruanos con aquellas disponibles en los bancos de genes nos permitió identificar variaciones previamente reportadas como la delección de 3 aminoácidos en la región N' terminal de los aislamientos pertenecientes a la cepa C respecto a las demás (Figura 6) (Tairo *et al.*, 2004). Sin embargo, también se observó nuevas variaciones entre los aislamientos del SPFMV. Por ejemplo, se detectó una delección de 14 aminoácidos (42 nucleótidos) ubicada en la región N-terminal de la proteína de cubierta del aislamiento M2-44 de la cepa EA, y que coincidentemente ha sido reportado como el aislamiento que causa síntomas más severos en camote durante la ocurrencia del sinergismo viral SPVD (Gutiérrez *et al.*, 2003). Aunque la frecuencia de delecciones en la región de la cubierta proteica de potyvirus no parece ser muy común, una delección de 12 aminoácidos fue reportada en aislamientos de *Yam mosaic virus* (Alemán-Verdaguer *et al.*, 1997).

En un estudio previo desarrollado por Gutiérrez *et al.* (2003), los aislamientos de SPFMV, M2-44, M2-41 y C18 aquí reportados como miembros de las cepas EA, RC y C, respectivamente, fueron comparados en su respuesta frente a diferentes antisueros, así como en la severidad de síntomas

inducidos en *I. nil* y camote. En ambos hospederos, el aislamiento M2-44 indujo los síntomas más severos, mientras que el aislamiento M2-41 produjo los síntomas más suaves. Sin embargo, Moyer *et al.* (1980) reportaron que el aislamiento C causó síntomas más suaves que el aislamiento RC (cepa RC), además, en Japón el aislamiento S (cepa RC) fue reportado como el más severo (Mori *et al.*, 1995). Aunque ningún aislamiento de la cepa EA fue incluida en este estudio, los resultados contradictorios obtenidos con relación a la severidad de los aislamientos C y RC en los estudios de Gutiérrez *et al.* (2003) y Moyer *et al.* (1980) sugieren que la severidad de los síntomas no podría estar necesariamente relacionada al tipo de cepa, sino que sería una característica de cada aislamiento. Esto último también parece ocurrir en la habilidad de infectar *N. benthamiana*, hospedero al que solamente algunos aislamiento de las cepas C y EA son capaces de infectar (Gutiérrez *et al.*, 2003; Moyer *et al.*, 1980). Para dilucidar estas aparentes contradicciones se hace necesario más estudios que deben incluir el secuenciamiento de la región 5' UTR de estos aislamientos ya que se conoce que esta región está involucrada en la infectividad y especificidad de la infección a determinados hospederos por el virus (Shi *et al.*, 2007).

Además de las diferencias biológicas encontradas entre las cepas del SPFMV, los resultados de los estudios moleculares demuestran que los aislamientos que pertenecen a la cepa C están filogenéticamente más distantes de las otras cepas y se ha sugerido que sean considerados como una nueva especie viral (Tairo *et al.*, 2005). Los análisis de distancia génica para el gen que codifica la cubierta proteica desarrollados en este estudio, revelan que los porcentajes de identidad nucleotídica y aminoacídica para aislamientos de la cepa C muestran valores que coinciden con aquellos previamente reportados (75.6-78.7 % nt, 79.5-85.2 aa) (Kreuze *et al.*, 2000; Tairo *et al.*, 2005). Estos resultados se encuentran en los límites de los recomendados para considerar a diferentes aislamientos virales como una sola especie de potyvirus (78% nt y 79% aa) (Adams *et al.*, 2005). Los resultados del análisis de la parte N-terminal del gen que codifica la replicasa o NIb muestran de igual forma resultados ambiguos (Figura 7). Por el contrario, el porcentaje de variabilidad encontrada



(80-85.4%) en la región 3'UTR (Figura 7), aparece muy por encima de lo recomendado para distinguir diferentes especies de potyvirus (76%) (Adams *et al.*, 2005). De acuerdo a los actuales datos, no es posible sugerir la reclasificación de la cepa C como uno nuevo virus y se sugiere el secuenciamiento del genoma completo de un aislamiento de este grupo para dilucidar este tema. Actualmente se tienen secuenciados aislamientos de las cepas RC y EA (Sakai *et al.*, 1997; Kreuze *et al.*, 2009), sin embargo, el Centro Internacional de la Papa viene secuenciando el genoma del aislamiento peruano C1 (cepa C) y los resultados preliminares muestran que la variabilidad en otras partes del genoma excede aquellos encontrados para las otras cepas de la misma especie (datos no publicados). Esto a su vez permitirá el desarrollo de métodos de diagnóstico apropiados para la detección de SPFMV cepa C, debido a que en la actualidad los anticuerpos policlonales y monoclonales no pueden reconocer los aislamientos de esta cepa (Mukasa 2003a, Tairo *et al.*, 2006).

Este trabajo también permitió reportar la primera evidencia de la existencia de aislamientos recombinantes en SPFMV. Las cuatro muestras conteniendo segmentos recombinantes fueron identificadas visualmente y la ocurrencia de éstos fue confirmada mediante el uso de programas de bioinformática especializados y análisis filogenéticos de las regiones involucradas (Figuras 9 y 10). El aislamiento recombinante YV fue amplificado y clonado de dos extracciones individuales de RNA para asegurar que la recombinación no se trataba de un error de la reacción de PCR. El hecho de que la misma recombinación se encuentra en el aislamiento C de los EE.UU., el cual fue clonado y secuenciado en diferentes tiempos, utilizando diferentes *primers* y en diferentes laboratorios, indica que es improbable que este evento haya sido un error de la PCR. Los aislamientos recombinantes Eg1 y Eg9 (Ishak *et al.*, 2003) comparten el mismo punto de recombinación en la región NIb y comparten el mismo espacio geográfico siendo muy posible que hayan compartido un antecesor común, algo que también pudo ocurrir con el aislamiento norteamericano identificado en este estudio. En la historia evolutiva de potyvirus, los fenómenos de recombinación no son nuevos y han sido reportados para

varios miembros de este género: *Yam mosaic virus* (Bousalem, 2000), *Yam mild mosaic virus* (Bousalem, 2003) *Potato virus Y* (Glais *et al.*, 2002, PVY, ), *Plum pox virus* (Glais *et al.*, 2004), *Turnip mosaic virus* (Ohshima *et al.*, 2007); *Lettuce mosaic virus* (Krause-Sakate *et al.*, 2004) y *Sugarcane mosaic virus* (SCMV, Zhong *et al.*, 2005); así como entre especies cercanamente relacionadas como *Bean common mosaic virus* (BCMV) y *Soybean mosaic virus* (Desbiez y Lecoq, 2004) *Bean common necrosis virus* y BCMV (Larsen *et al.*, 2005) y otros virus relacionados (Valli *et al.*, 2007). Estos reportes dan cuenta del rol importante de la recombinación en la evolución del género *Potyvirus*, aunque sus frecuencias pueden variar significativamente entre especies. La importancia biológica de estos eventos de recombinación radica en que permite la aparición de nuevas cepas más virulentas de una especie viral (Glais, 2002; Zhong, 2005) e incluso en la aparición de nuevas especies (Desbiez y Lecoq, 2004; Valli *et al.*, 2007) o géneros (Valli *et al.*, 2007).

La identificación de dos amplicones pertenecientes a otros potyvirus denominados SPV2 y SPVG, en muestras provenientes de campos de Huaral constituye el primer reporte de estos virus en Perú y Sudamérica. Los análisis filogenéticos realizados destacan que el aislamiento Hua 2 de SPV2, está más cercanamente relacionado a un aislamiento sudafricano (Ateka *et al.*, 2007). La poca información disponible con respecto a este virus no permitió plantear alguna conclusión respecto a la clasificación taxonómica de este aislamiento. Un caso similar se observó en el SPFMV en el que por mucho tiempo los aislamientos de la cepa EA se creían restringidos a países de Este de África; sin embargo, en la actualidad gracias a nuevos muestreos realizados, se sabe que éstos se encuentran distribuidos a nivel mundial (este estudio, Valverde *et al.*, 2004). En caso del SPVG, el aislamiento Hua 3 conformaría un nuevo *cluster* dentro de la actual clasificación de este virus. En las evaluaciones serológicas de rutina del banco de germoplasma del CIP y de productores de semilla de camote de Huaral y Cañete se observa que el SPVG es detectado regularmente en el 30% de las muestras sintomáticas y es más prevalente que el SPV2 que es sólo fue detectado en el 3% (Gutierrez *et al.*, 2003). Se conoce que el SPFMV es

el virus más disperso, ya que se encuentra en el 90% de las muestras sintomáticas, y en consecuencia los otros potyvirus no tendrían una alta contribución a las pérdidas de producción causadas por el SPVD. Aunque se ha demostrado que las concentraciones de todos estos virus se incrementan luego de la coinfección con el SPCSV, la concentración del SPFMV se incrementa en mayor cantidad que la de los otros potyvirus (Kokkinos y Clark, 2006; Untiveros *et al.*, 2007). Esta tasa de replicación más alta en las co-infecciones con el SPCSV, podría proveer una explicación para la prevalencia del SPFMV sobre los otros potyvirus que se encontrarían en desventaja. Esto también implica que si se encuentra u obtiene cultivares de camote con resistencia al SPFMV únicamente, los otros potyvirus podrían rápidamente reemplazarlo, causando síntomas similares aunque menos severos que los del SPVD (Untiveros *et al.*, 2007). Debido a que el antisuero disponible para el SPFMV muestra reacciones serológicas débiles con el SPVG así como con el SPV2, la infección con estos virus podría haber sido atribuida a SPFMV, y por ello sus prevalencias a nivel mundial pueden ser mayores de los que actualmente se conocen. En la actualidad, el desarrollo de anticuerpos específicos para el SPVG y SPV2 está facilitando la detección de ambos virus en muestras provenientes de diferentes países, discriminándolos de la presencia de SPFMV (Gutierrez *et al.*, 2003)

La información obtenida en el presente estudio respecto a la variabilidad genética de aislamientos peruanos de SPFMV y otros potyvirus, contribuirá al diseño de estrategias para el manejo y control de estos virus. Para ello, serán necesarios futuros estudios epidemiológicos de la incidencia de cada una de las cepas en las distintas zonas camoterías. Se podrán desarrollar mejores métodos de detección para cada cepa, siendo la alternativa más económica la del desarrollo de sondas específicas para cada cepa basadas en las secuencias de aislamientos proporcionadas por este estudio. Asimismo, este trabajo contribuye con información para los programas de búsqueda de genotipos resistentes al SPVD, pues proporciona información de la existencia de SPVG y SPV-2 en el Perú y por tanto los genotipos resistentes a SPVD deberán ser evaluados

también con estos otros dos virus, para prevenir la emergencia de otras enfermedades sinérgicas.

El análisis filogenético de varias muestras de los tres virus identificados en este estudio, junto con un grupo representativo de otros potyvirus, nos permitió descubrir que estos virus forman un sub-grupo filogenético bien demarcado dentro del género de los potyvirus (Figura 13), junto a un virus desconocido reportado en Zimbawe (Chavi *et al.*, 1997). Además de la notable similitud en la secuencia (incluyendo los últimos 20 nucleótidos), este grupo al que denominamos "Sub-Grupo del SPFMV" se distingue por tener un rango de hospederos no muy amplio, restringido principalmente a la Familia *Convolvulaceae*, algo que probablemente indique un ancestro evolutivo común que se adaptó a esta familia de hospederos. De otro lado, aquellos dos potyvirus adicionales que infectan el camote como es el caso de SwPLV y SPMSV y que además incluyen en su rango de hospederos a las Familias *Chenopodáceas* y *Solanaceas* (Loebenstein *et al.*, 2003) no están filogenéticamente relacionados al "Sub-Grupo del SPFMV". Cabe destacar que anteriormente se han identificado otros sub-grupos de potyvirus de manera similar (Figura 4). Éstos incluyen al "Sub-Grupo de SCMC", que infecta principalmente gramíneas (Shukla *et al.*, 1994), el "Sub-Grupo de BCMV" que infecta principalmente legumbres (Shukla *et al.*, 1994), y el "Sub-Grupo del PVY" (Spetz *et al.*, 2003). La existencia de estos sub-grupos dentro los potyvirus podrían sugerir un rol significativo de la co-evolución hospedero-virus en la especiación de los potyvirus. Estudios futuros en el secuenciamiento de los genomas del SPV2, SPVG y SPFMV-C, podrían dar más luces en las características específicas requeridas para la adaptación a hospederos en la familia *Convolvulácea*, aunque la identificación de regiones altamente conservadas en la proteína P1 de SPFMV y del *ipomovirus Sweet potato mild mottle virus*, SPMMV (Valli *et al.*, 2007), ya alude a esta proteína un rol importante en la especificidad al hospedero.

## VII. CONCLUSIONES

1. Se encontró que el método del trizol y posterior precipitación con LiCl 4M, constituye un método efectivo de extracción de RNA total de hojas de camote para fines de nuestro trabajo.
2. Las condiciones de PCR aplicadas permitieron la amplificación de la región de interés (~1.8 Kb) conteniendo la región 3'N de la proteína NIb, la cubierta proteica y la región 3'UTR, lográndose clonar 18 fragmentos de interés provenientes de aislamientos peruanos (17) y americanos (1).
3. Las secuencias de aislamientos peruanos conservan ciertas características reportadas en otros aislamientos, como el aminoácido serina iniciador de la secuencia de la proteína de la cubierta proteica, el motivo DAG necesario para la transmisión del virus por vectores, un *gap* de 6 nucleótidos en los miembros de la cepa C y valores medios de identidad menores en la cepa C con respecto a las otras cepas.
4. Se reportan por vez primera singularidades para SPFMV: un evento de delección de 13 aminoácidos en el aislamiento peruano M2-44; así como eventos de recombinación en los aislamientos (EG1, EG9, YV y C) y determinándose los puntos de recombinación de éstos (posiciones 570 y 1473 de los fragmentos en estudio).
5. La variabilidad genética del SPFMV en el Perú involucra a tres de las cuatro variantes del SPFMV siendo ésta la primera vez que se reporta aislamientos pertenecientes a la cepa EA en el continente americano.
6. Se reporta por primera vez a los virus SPVG y SPV-2 en campos de cultivo de Perú y Sudamérica, éstos corresponden a los aislamientos Hua2 y Hua 3 respectivamente; se reporta una inserción de 6 nt en el aislamiento Hua2 de SPVG y conformaría un nuevo cluster dentro de esta especie de potyvirus; en tanto que el

aislamiento Hua 3 (SPV2) se encuentra más cercanamente relacionado al aislamiento Thomas16A (Sudáfrica).

7. Se demuestra la conformación de un nuevo cluster de potyvirus adicional a los ya reportados conformado por SPFMV, SPVG, SPV2 y un aislamiento Zim no agrupado y tiene como rango de hospederos únicamente a plantas de la familia *Convolvulacea*.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abad J.A., French R.D. y Moyer J.W. 1992a. Double stranded (ds) RNA analysis of the whitefly component of the sweet potato virus disease (SPVD-WF) of sweet potato. *Phytopathology* 82, 1170 (Abstract).
2. Abad J.A., Conkling M.A. y Moyer J.W. 1992b. Comparison of the capsid proteic cistron from serologically distinct strains of sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) *Archives of Virology* 126, 147-157.
3. Adams M.J., Antoni J.F., Fauquet C.M. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Archives of Virology* 150,459–479.
4. Aleman-Verdaguer M-E., Goudou-Urbino C., Dubern J., Beachy R.N., Fauquet C.1997. Analysis of the sequence diversity of the P1, HC, P3, NIb and CP genomic regions of several yam mosaic potyvirus isolates: implications for the intraspecies molecular diversity of potyviruses. *Journal of General Virology* 78, 1253–1264.
5. Alvarez V., Nome S.F. y Duchase D. A. V. 1998. Clonado, secuenciación y expresión de la proteína de la cápside de tres potyvirus asociados al enanismo clorótico de la batata. *Fitopatología (Perú)* 33(1):14.
6. Anandalakshmi R., Pruss G.J., Ge X., Marathe R., Mallory A.C., Smith T.H., y Vance V.B. 1998. A viral suppressor of gene silencing in Plants. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 95, 13079-13084.
7. Aritua V., Adipala E., Carey E., y Gibson R. 1998. The incidence of sweet potato virus disease and virus resistance of sweet potato grown in Uganda. *Annals of Applied Biology* 132, 399-411.
8. Ateka E. M., Njeru R. W., Kibaru A. G., Kimenju J. W., Barg E., Gibson R. W., and Vetten H. J. 2004. Identification and distribution of viruses infecting sweet potato in Kenya. *Annals of Applied Biology* 144:371-379.
9. Ateka E.M., Barg E., Njeru R.W., Thompson G., Vetten H.J. 2007. Biological and molecular variability among geographically diverse isolates of sweet potato virus 2. *Archives of Virology* 152, 479–488.

10. Atreya C.D., Atreya P.L., Thornbury D.W., y Pirone T.P. 1992. Site directed mutations in the potyvirus HC-Pro gene affect helper component activity, virus accumulation and symptom expression in infected tobacco plants. *Virology* 191, 106-111.
11. Atreya P.L., Lopez-Moya J.J., Chu M., Atreya C.D. y Pirone T.P. 1995. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *Journal of General Virology* 76, 265-270.
12. Bousalem M., Dallot S., Fuji S., Natsuaki K.T. 2003. Origin, world-wide dispersion, bio-geographical diversification, radiation and recombination: an evolutionary history of Yam mild mosaic virus (YMMV). *Infection, Genetics and Evolution* 3, 189–206.
13. Bousalem M., Douzery E.J., y Fargette D. 2000. High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of Yam mosaic virus: a contribution to understanding potyvirus evolution. *Journal of General Virology* 81, 243–255.
14. Carrington, J.C., Cary, S.M., Parks, T.D y Dougherty, W.G. 1989. A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *The EMBO Journal* 8, 365-370.
15. Carrington J.C., Freed D.D., y Oh C.S. 1990. Expression of the potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. *The EMBO Journal* 9, 1347-1353.
16. Carrington J.C., Jensen P.E. y Schaad M.C. 1998. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant Journal* 14, 393-400.
17. Castel A., Kraal B., De Graaf J.M. y Bosch L. 1979. The primary structure of the coat protein of alfalfa mosaic virus strain VRU. A hypothesis on the occurrence of two conformations in the assembly of the protein shell. *European Journal of Biochemistry* 102, 125-138.
18. Chamberlain E.E. 1954. *Plant Virus Diseases in New Zealand*, Vol. 108. R.E.Owen, Government Printer, Wellington.
19. Chare E.R. y Holmes E.C. 2006. A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Archives of Virology* 151, 933-946.



20. Chavi F., Robertson A., y Verduin B.J.M. 1997. Survey and characterization of viruses in sweetpotato from Zimbabwe. *Plant Disease* 81,1115–1122.
21. Chung B.Y.W., Miller W.A., Atkins J.F. y Firth A.E. 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proceedings of National Academy of Sciences* vol. 105, issue 15, pp. 5897-5902.
22. Clark C. A. y Moyer J. W. 1988. *Compendium of Sweet Potato Diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 74 p.
23. Colinet D., Kummert J., Lepoivre P. y Semal J. 1993. Identification of distinct potyviruses in Mixedly-Infected Sweet potato by the Polimerasa Chain Reaction with Degenerate Primers. *Phytopathology* 84, 65-69.
24. Colinet D., Kummert J., y Lepoivre P. 1994. The complete nucleotide sequences of the coat protein cistron and the 3' non-coding region of a newly-identified potyvirus infecting sweet potato, as compared to those of sweet potato feathery mottle virus. *Archives of Virology* 139,327-336.
25. Colinet D., Kummert J.y Lepoivre P. 1997. Evidence for the assignment of two strains of SPLV to the genus Potyvirus based on coat protein and 3' non-coding region sequence data. *Virus Research*, Volume 49, Issue 1, pp. 91-100
26. Colinet D., Kummert J. y Lepoivre P. 1998. The nucleotide sequence and genome organization of the whitefly transmitted sweet potato mild mottle virus: a close relationship with members of the family Potyviridae. *Virus Research* 53 187-196.
27. Cucho V.F. 1993. Distribución de los principales virus del camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) en el sur chico del Perú (Nazca-Cañete). Tesis para la obtención de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Fac. de Agronomía, Ica (Perú), 1993. 86 p.
28. Cuellar W., Kreuze J., Rajamäki M.L., Cruzado K., Untiveros M., y Valkonen J.P.T. 2009. Elimination of antiviral defense by viral RNase III. *Proceedings of National Academy of Sciences* 106, 10354–10358.
29. Desbiez C. y Lecoq H. 2004. The nucleotide sequence of Watermelon mosaic virus (WMV, Potyvirus) reveals interspecific recombination between two related potyviruses in the 5' part of the genome. *Archives of Virology* 149, 1619–1632.

30. Di Feo L., Nome S.F., Bideborst E., Fuentes S. y Salazar L. 2000 Etiology of Sweet potato Chlorotic Disease in Argentina. *Plant Disease* 84, 35-39.
31. Dolja V.V., Haldeman R. Robertson N. Dougherty W.G. y Carrington J.C. 1994. Distinct functions of the capsid protein in assembly and cell-to-cell movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO Journal* 13, 1482-1491.
32. Domier L.L., Shaw J.G. y Rhoads R.E., 1987. Potyviral proteins share amino acid sequence homology with picorna-como- and caullimovirus proteins. *Virology* 158,20-27.
33. Domingo E. y Holland J.J. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 151-178.
34. Doolittle R.F. (ed.) 1990. *Molecular Evolution: Computer Analysis of Protein and Nucleic Acid Sequences*. Academic Press, San Diego.
35. Dougherty W.G., Parks T.D., Cary S.M., Bazan J.F. y Gletterick R.J. 1989. Characterization of the catalytic residues of the Tobacco etch virus 49-kDa proteinase. *Virology* 172, 302-310.
36. FAO, 2008. <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.spx?PageID=567&lang=en>
37. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. y Ball L.A., 2005. *Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA.
38. Felsenstein, J. 1984. Distance methods for inferring phylogenies: a justification. *Evolution* 38: 16-24.
39. Francki R.I.B., Fauquet C.M., Knudson D.L. y Brown, F., 1991. Classification and Nomenclature of viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Vol. *Archives of Virology*(Suppl. 2). Springer-Verlag, New York.
40. Frenkel M.J., Ward C. y Shukla D.D., 1989. The use of 3'-non coding nucleotide sequence in the taxonomy of potyviruses: application to Water melon mosaic virus 2 and Soybeanmosaic virus. *Journal of General Virology* 70, 2775-2783.
41. Fuentes S. 1994. Identificación preliminar de un virus de camote. Resúmenes del XIII Congreso Peruano de Fitopatología. *Fitopatología (Perú)* 29(1),38.

42. Fuentes S. y Salazar L. 1992. Identificación de un nuevo virus de camote. Resúmenes de los Trabajos presentados en el XII Congreso Peruano de Fitopatología. Fitopatología (Perú) 27(2),49.
43. Gibbs A. y Mackenzie A. 1997. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR Journal of Virological Methods 63, (1-2)
44. Gibson R. W., Mpembe I., Alicia T., Carey E. E., Mwanga R.O..M., Seal S.E. y Vetten H. J. 1998. Symptoms, aetiology and serological analysis of sweet potato virus disease in Uganda. Plant Pathology 47, 95-102.
45. Glais L., Tribodet M., Kerlan C. 2002. Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVYNW and PVYNTN variants are single to multiple recombinants between PVYO and PVYN isolates. Archives of Virology 147, 363–378.
46. Glasa M., Palkovics L., Kominek P., Labonne G., Pittnerova S., Kudela O., Candresse T., y Subr Z. 2004. Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of Plum pox virus (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. Journal of General Virology 85, 2671–2681
47. Gribskov M. y Devereux J. (eds) 1991. Sequence Analysis Primer. M Stockton Press, New York.
48. Gutiérrez D., Fuentes S., y Salazar L.F. Distribution, Incidence, and Effect of SPCSV on Sweetpotato Yield in Peru. 2003. Plant Disease 87, 297 – 302.
49. Haldeman-Cahill R., Daros J.A. y Carrington J.C. 1998. Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' non-translated region involved in the amplification of the tobacco etch virus genome. Journal of General Virology 72, 4072-4079.
50. Hansen J.L., Long A.M. y Schultz S.C. 1997. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. Structure 5, 1109-1122.
51. Hasegawa M., Kishino H., and Yano T. 1985. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. Journal of Molecular Evolution 22:160-174.
52. Hong Y. y Hunt A.G., 1996. RNA polymerase activity catalyzed by potyvirus encoded RNA-dependent RNA polymerase. Virology 226, 146-151.

53. INIA. Portal en internet. Oficinas de imagen institucional. Junio 2007 <http://www.inia.gob.pe/notas/nota035/>
54. Ishak J.A., Kreuze J.F., Johansson A., Mukasa S.B., Tairo F., Abo El-Abbas F.M., y Valkonen J.P.T. 2003. Some molecular characteristics of three viruses from SPVD-affected sweet potato plants in Egypt. *Archives of Virology* 148, 2449–2460.
55. Jagadish M.N., Huang D. y Ward C.W. 1993. Site-directed mutagenesis of a potyvirus coat protein and its assembly in *Escherichia coli*. *Journal of General Virology* 74, 893-896.
56. Karyeija R.F., Kreuze J.F., Gibson R.W. y Valkonen J.P.T. 2000. Synergistic interactions of potyvirus and a phloem-limited crinivirus in sweet potato plants. *Virology* 296, 26-36.
57. Kasschau K.D. y Carrington J.C. 1995. Requirement for HC-Pro processing during genome amplification of Tobacco etch potyvirus. *Virology* 209, 268-273.
58. Kasschau K.D., Cronin S. y Carrington J.C 1997. Genome amplification and long distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* 228: 251-262.
59. Kasschau K.D y Carrington J.C. 1998. A counterdefensive strategy of plant virus: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95, 461-470.
60. Kekarainen T., Savilahti H. y Valkonen J.P.T. 2002. Functional genomics of Potato virus A: virus genome-wide map of sites essential for virus propagation. *Genome Research* 12, 584-594.
61. Kennedy G.G. y Moyer J. W. 1982 Aphid transmission and separation of two strains of SPFMV from sweet potato. *Journal of Economical Entomology* 75, 130-133.
62. Khan J, y Dijkstra J 2002. Plant viruses as molecular pathogens. The Haworth Press, Inc.
63. Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary sequences between homologous nucleotide sequences, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 454–458.
64. Kokkinos C. D. y Clark C. A. 2006. Interactions among Sweet potato chlorotic stunt virus and Different Potyviruses and Potyvirus Strains Infecting Sweetpotato in the United States. *Plant Disease* 90:1347–1352.

65. Krause-Sakate R, Fakhfakh H, Peypelut M, Pavan MA, Zerbini FM, Marrakchi M, Candresse T, y Le Gall O. 2004. A naturally occurring recombinant isolate of Lettuce mosaic virus. *Archives of Virology* 149, 191–197.
66. Kreuze J.F., Karyeija R.F., Gibson R.W. y Valkonen J.P.T. 2000. Comparisons of coat protein gene sequences show that East African isolates of Sweet potato feathery mottle virus form a genetically distinct group. *Archives of Virology* 145, 567-574.
67. Kreuze J.F., Perez A., Untiveros M., Quispe D., Fuentes S., Barker I., Simon R. 2009. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology* 25;388(1).
68. Kumar S., Tamura K., Nei M. 2004. MEGA4: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics* 5,150–163.
69. Lai M.M.C. 1992. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiology Review* 56, 61-79.
70. Lain S., Riechmann J.L. y Garcia J.A. 1990. RNA helicase: A novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Research* 18, 7003-7006.
71. Liao C.H., Chien K., Chung M.L., Chiu R.J. and Han Y.H. 1979. A study of sweet potato virus disease in Taiwan: *Sweet potato yellow spot virus* disease. *Journal of Agricultural Research in China* 28, 127-138
72. Larsen R.C., Miklas P.N., Druffel K.L., Wyatt S.D. 2005. NL-3 K strain is a stable and naturally occurring interspecific recombinant derived from *Bean common mosaic necrosis virus* and *Bean common mosaic virus*. *Phytopathology* 95, 1037–1042
73. Loebenstein G., Fuentes S., Cohen J., Salazar L.F. 2003. Sweet potato. In: Loebenstein G, Thottappilly (eds) *Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries*. Kluwer, Dordrecht, pp 223–248
74. Martin D.P., Williamson C., Posada D. 2005. RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 21,260–262
75. Matthews R.E.F. 1991. *Plant Virology*, 3rd edn. Academic Press, London.

76. Maynard-Smith J. 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *Journal of Molecular Evolution* 34,126–129.
77. McClure M.A., Vasi T.K. y Fitch W.M. 1993. Comparative analysis of multiple protein sequence alignment methods. *Molecular and Biological Evolution*. 11, 571-592.
78. MacFarlane S., 1997. Natural recombination among plant virus genomes: evidence from tobnaviruses. *Seminars in Virology* 8, 25-31.
79. Merits A., Guo D.Y., Järvekulg L. y Saarma M. 1999. Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology* 263, 15-22.
80. Milgram M., Cohen J., y Loebenstein G. 1996. Effects of sweet potato feathery mottle virus and sweet potato sunken vein virus on sweet potato yields and rates of reinfection of virus-free planting material in Israel. *Phytoparasitica* 24, 189-193.
81. Mori M, Sakai J, Kimura T, Usugi T, Hayashi T, Hanada K, Nishiguchi M. 1995. Nucleotide sequence analysis of two nuclear inclusion body and coat protein genes of a sweet potato feathery mottle virus severe strain (SPFMV-S) genomic RNA. *Archives of Virology* 140,1473–1482.
82. Moyer J.W., Kennedy G.G., y Abou-Ghadi M.F. 1980. Identification of two sweet potato feathery mottle virus strains in North Carolina. *Plant Dis* 64: 762–764.
83. Moyer J.W. y Salazar L.F. 1989. Virus and virus-like diseases of Sweet Potato. *Plant Disease* 73, 451-455.
84. Mukasa S.B., Tairo F., Kullaya A., Rubaihayo P.R. y Valkonen J.P.T. 2003a. Coat protein sequence analysis reveals occurrence of new strains of sweet potato feathery mottle virus in Uganda and Tanzania. *Virus Genes*, 27, 49–56.
85. Mukasa S. B., Rubaihayo P. R., y Valkonen J. P. T. 2003b. Incidence of viruses and viruslike diseases of sweetpotato in Uganda. *Plant Disease* 87,329-335.
86. Ohshima K., Tomitaka Y., Wood J.T., Minematsu Y., Kajiyama H., Tomimura K., Gibbs A.J. 2007. Patterns of recombination in turnip mosaic virus genomic

- sequences indicate hotspots of recombination. *Journal of General Virology* 88, 298–315.
87. Onwueme I.C. y Charles W.B. 1994. Tropical root and tuber crops FAO. Plant Production and Protection Paper 126 FAO of UN, Rome Italy.
  88. Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1253-1256.
  89. Querci M., Fuentes S. y Salazar L.F. 1992. Construction, cloning and use of radioactive RNA probes for the detection of the Peruvian strain C1 of sweet potato feathery mottle virus. *Fitopatología* 27, 93-97.
  90. Rajamäki M.L. y Valkonen J.P.T. 1999. The 6k2 protein and the VPg of potato virus A are determinants of systemic infection in *Nicotiana glauca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 1074-1071.
  91. Rännäli M., Czekaj, V., Jones R. A. C., Fletcher J. D., Davis R. I., Mu L., Dwyer G. I., Coutts, B. A., y Valkonen J. P. T. 2008. Molecular genetic characterization of Sweet potato virus G (SPVG) isolates from areas of the Pacific Ocean and southern Africa. *Plant Disease* 92, 1313-1320.
  92. Reichmann J.L., Lain S. y Garcia J.A. 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* 73, 1-16.
  93. Revers F., Le Gall O., Le Romancer M. y Dunez J., 1996. Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *Journal of General Virology* 77, 1953-1965.
  94. Roberts I.M., Wang D., Findlay K. y Maule A.J. 1998. Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology* 245, 173-181.
  95. Roossinck M.J., 1997. Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Review of Phytopathology* 35, 191-206.
  96. Rossel H. W. y Thottappilly G. 1988. Complex virus diseases of sweet potato. Pages 291-302 in: *Exploration, Maintenance and Utilisation of Sweet Potato Genetic Resources*. Report of first Sweet Potato planning Conference 1987. International Potato Center, Lima, Peru.

97. Rubio T., Borja M., Scholthof H.B., Feldstein P.A., Morris T.J. y Jackson A.O. 1999. Broad-spectrum protection against tombusviruses elicited by defective interfering RNAs in transgenic plants. *Journal of Virology* 73, 5070-5078.
98. Salazar L. y Jayasinghe U. 1997. Techniques in Plant Virology at CIP. Centro Internacional de la Papa – Departamento de fortalecimiento de Capacidades
99. Salazar L. y Fuentes S. 2000. Current knowledge on major virus disease of sweet potatoes. En International Workshop on Sweet potato Cultivar decline Study, pp. 14-19. Miyajakonojo, Japón.
100. Sakai J., Mori M., Morishita T., Tanaka M., Hanada K. y Usugi T. 1997 Complete nucleotide sequence and genome organization of sweet potato feathery mottle (S strain) genomic RNA: the large coding region of P1 gene. *Archives of Virology* 142, 1553-1562.
101. Sánchez F., Wang X., Jenner C.E., Walsh J.A. y Ponz F., 2003. Strains of *Turnip mosaicpotyvirus* as defined by the molecular analysis of the coat protein gene of the virus. *Virus Research* 94, 33-43.
102. Schaad M.C., Haldeman-Cahill R., Cronin S. y Carrington J.C. 1996. Analysis of the VPg-proteinase (Nla) encoded by tobacco etch potyvirus: Effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *Journal of Virology* 70, 7039-7048.
103. Schaad M.C. Lellis A.D. y Carrington J.C. 1997. VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long distance movement *Journal of Virology* 71, 8624-8631.
104. Sheiffield F.M.L., 1957. Virus diseases of sweet potato in East Africa. Identification of viruses and their insect vectors. *Phytopathology* 47, 582-590.
105. Shi Y., Chen J., Hong X., Chen J. y Adams M.J. 2007. A potyvirus P1 protein interacts with the Rieske Fe/S protein of its host. *Molecular Plant Pathology* 8, 785–790
106. Shukla D.D. y Ward C.W., 1988. Amino acid sequence homology of coat proteins as a basic for identification and classification of the potyvirus group. *Journal of General Virology* 69, 2703-2710.



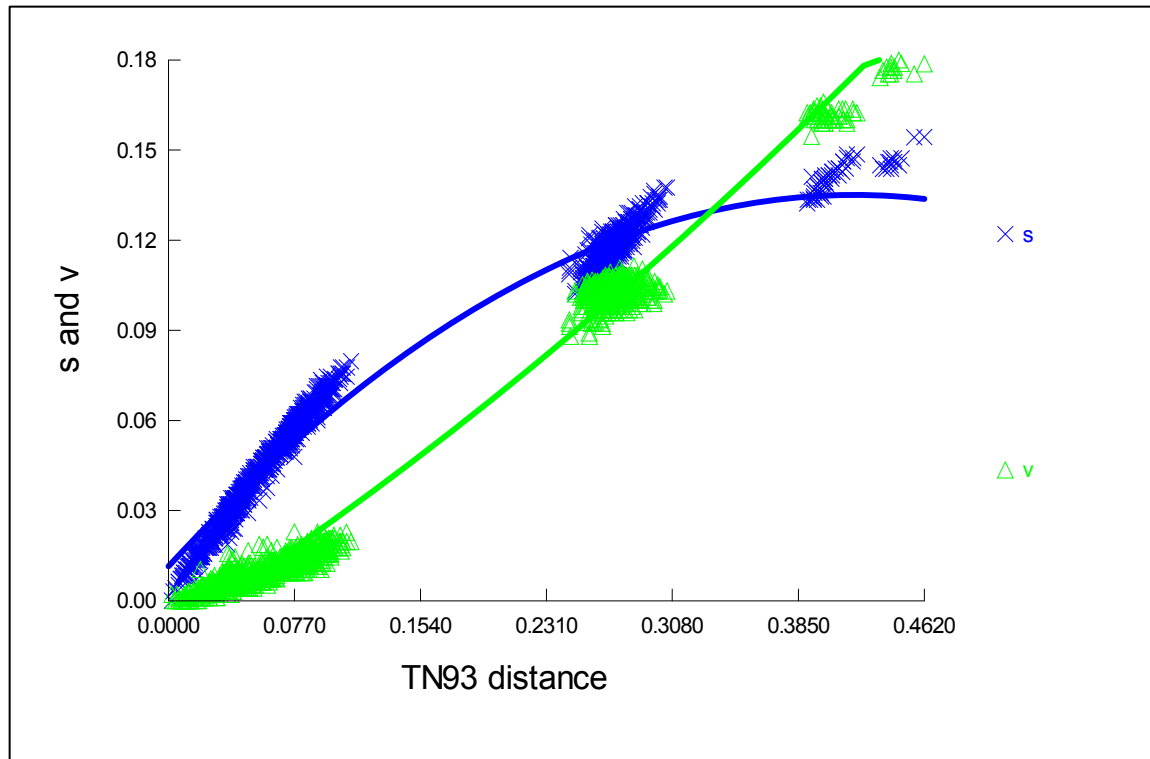
107. Shukla D.D. y Ward C.W., 1989a. Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. *Archives of Virology* 106, 171-200.
108. Shukla D.D. y Ward C.W., 1989b. Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Advances in Virus Research* 36, 273-314.
109. Shukla D.D., Ward C.W., Brunt A.A. 1994. *The Potyviridae*. CAB international, Littlehampton, UK, p 516.
110. Souto E. R., Sim J., Chen J., Valverde R. A., y Clark C. A. 2003. Properties of strains of Sweet potato feathery mottle virus and two newly recognized potyviruses infecting sweet potato in the United States. *Plant Disease* 87,1226-1232.
111. Spetz C., Taboada A.M., Darwich S., Ramsell J., Salazar L.F., Valkonen J.P.T. 2003. Molecular resolution of a complex of potyviruses infecting solanaceous crops at the centre of origin in Peru. *Journal of General Virology* 84,2565–2578.
112. Spetz C. y Valkonen J.P.T. 2004. Potyviral 6K2 Protein Long-Distance Movement and Symptom-Induction Functions Are Independent and Host-Specific. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 502-510.
113. Tairo F., Kullaya A., y Valkonen J. P. T. 2004. Incidence of viruses infecting sweetpotato in Tanzania. *Plant Disease* 88, 916-920.
114. Tairo F. Mukasa S.B., Jones R.A.C., Kullaya A., Rubaihayo P.B., y Valkonen J.P.T. 2005. Unravelling the genetic diversity of the three main viruses involved in Sweet Potato Virus Disease (SPVD), and its practical implications. *Molecular Plant Pathology* 6(2), 199-211.
115. Tairo F., Jones R. A. C., y Valkonen J. P. T. 2006. Potyvirus complexes in sweetpotato: Oc-currence in Australia, serological and molecular resolution, and analysis of the Sweet potatovirus 2 (SPV2) component. *Plant Disease* 90,1120-1128.
116. Tamura K., y Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10, 512-526.

117. Tan Z., Wada Y., Chen J. y Ohshima K. 2004. Inter- and intralineage recombinants are common in natural populations of Turnip mosaic virus. *Journal of General Virology* 85, 2683–2696.
118. Tavaré S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences*, 17, 57-86.
119. Thresh J.M., 1986. The control of cocoa swollen shoot disease in Ghana: an evaluation of eradication procedures. *Crop Protection* 5, 41-52.
120. Trigiano, T.N., Windham, M.T. and Windham, A.S., 2003. *Plant Pathology: Concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press, Florida.
121. Untiveros M., Fuentes S., Salazar L.F. 2007. Synergistic interaction of Sweet potato chlorotic stunt virus (Crinivirus) with carla-, cucumo-, ipomo- and potyviruses infecting sweet potato. *Plant Disease* 91, 669–676.
122. Urcuqui-Inchima S., Haenni A y Bernardi F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research* 74, 157-175.
123. Van Regenmortel, H.V., 1990. Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification. *Intervirology* 31, 241-254.
124. Uyeda I., 1992. *Bean yellow mosaic virus* subgroup: search for the group specific sequences in the 3' terminal region of the genome. *Archives of Virology* 5, 377-385.
125. Valli A., Lopez-Moya J.J., García J.A. 2007. Recombination and gene duplication in the evolutionary diversification of P1 proteins in the family *Potyviridae*, *Journal of General Virology* 88, 1016–1028
126. Valverde R.A., Lozano G., Navas-Castillo J., Ramos A., y Valdés F. 2004. First report of Sweet potato chlorotic stunt virus and Sweet potato feathery mottle virus infecting sweet potato in Spain. *Plant Dis.* 88: 428
127. Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R. y Wickner R.B. 2000. *Virus Taxonomy: The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA, USA: Academic Press.
128. Wang D. y Maule A.J. 1994. A model for seed transmission of a plant virus: Genetic and structural analyses of pea embryo invasion by pea-seed-borne mosaic virus. *Plant Cell* 6, 777-787.

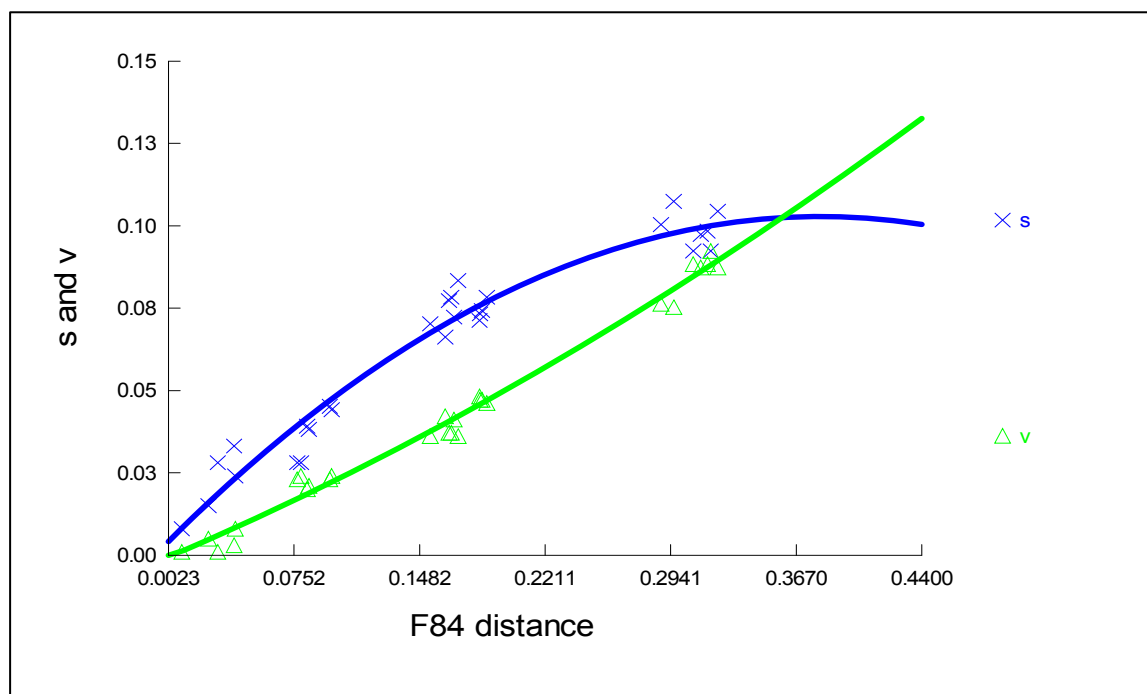
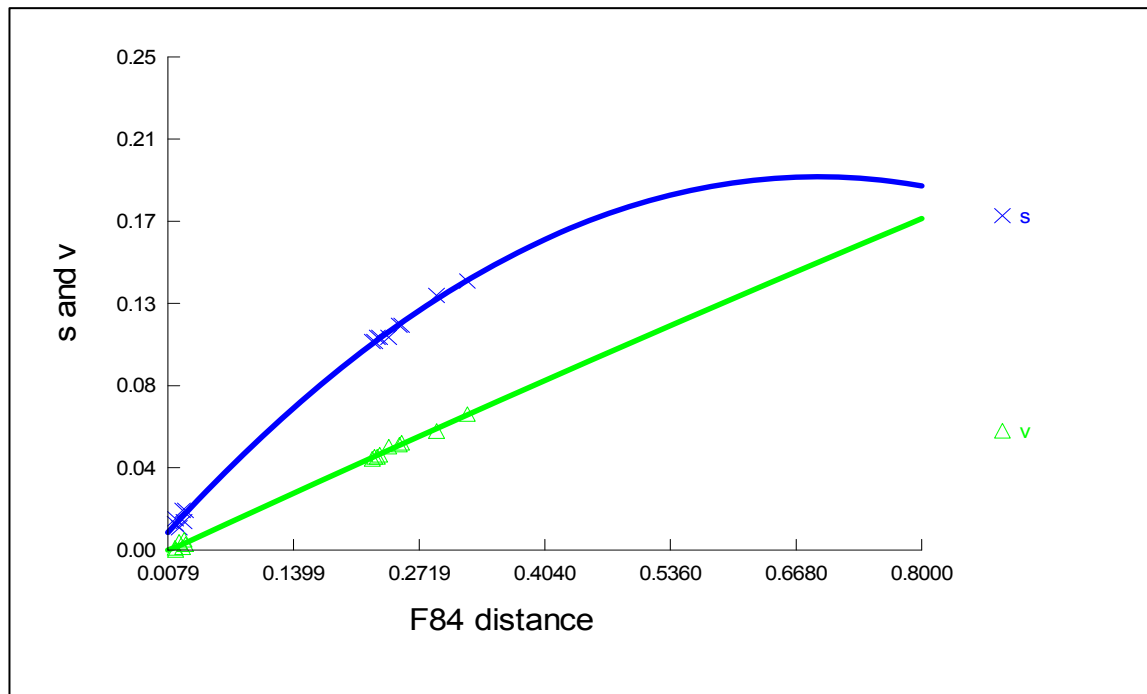
129. Waterman, M.S. (ed.) (1988). Mathematical Methods for DNA Sequences. CRC Press, Boca Raton, FL.
130. Weiller G.F., McClure M.A. y Gibbs A.J. 1995. Molecular phylogenetic analysis. In: A.J. Gibbs, C.H. Calisher and F. Garcia-Arenal (eds) Molecular Basis for Virus Evolution, pp. 553-585. Cambridge University Press, Cambridge.
131. Wittman S., Chatel H., Fortin M.G. y Laliberte J.F. 1997. Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* 234, 84-92.
132. Wutscher, H.K., 1977. Citrus tree virus and virus-like diseases. *Horticultural Science* 12, 478-484.
133. Xia, X. and Z. Xie. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92, 371-373
134. Zhong Y., Guo A., Li C., Zhuang B., Lai M., Wei C., Luo J., y Li Y. 2005. Identification of natural occurring recombinant isolate of *Sugarcane mosaic virus* causing maize dwarf mosaic disease. *Virus Genes* 30, 75–83

## IX ANEXOS

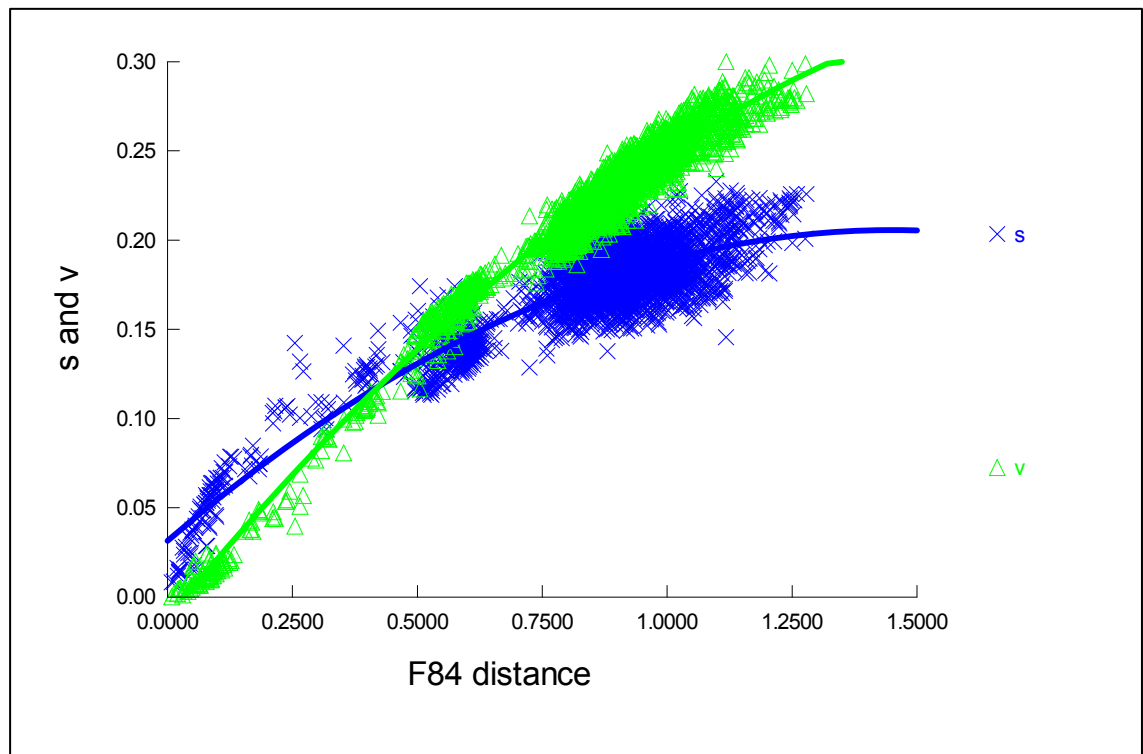
**Anexo 1.** Distribución de transiciones y transversiones de las secuencias nucleotídicas de la proteína de cubierta de asilamientos de SPFMV con respecto a la distancia genética con el modelo de saturación nucleotídica TN93. Nótese que las transiciones presentan cierto nivel de saturación, mas no las transversiones.



**Anexo 2.** Distribución de transiciones y transversiones de las secuencias nucleotídicas de la proteína de cubierta de asilamientos de SPVG (arriba) y SPV2 (abajo) con respecto a las distancias genéticas con los modelos de saturación nucleotídica F84. Nótese que las transiciones presentan cierto nivel de saturación en el caso de SPV2, más no en el caso de SPVG.



**Anexo 3.** Distribución de transiciones y transversiones de las secuencias nucleotídicas de la proteína de cubierta de asilamientos de especies del género de los *potyvirus* con respecto a la distancia genética con el modelo de saturación nucleotídica F84. Nótese que las transiciones y transversiones presentan cierto nivel de saturación.



**Anexo 4.** Resultados de la prueba de Modeltest aplicados a las secuencias nucleotídicas de la CP de aislamientos de SPFMV. Para la selección del mejor modelo de sustitución, se utilizó el criterio bayesiano (BIC) y se siguió una topología de NJ. El modelo utilizado debido a su disponibilidad se encuentra en cursiva.

**Settings:**

Phyml version = 2.4.4

Candidate models = 88

Base tree for likelihood calculations = BIONJ tree

sample size = 1007 nt

number of sequences = 61

**Model selected:**

Model = TIM1+G

gamma shape = 0.3660

CRITERIO DE INFORMACION BAYESIANO (BIC)

SELECCION DE MODELO:

<b>Model</b>	<b>-lnL</b>	<b>K</b>	<b>BIC</b>	<b>delta</b>	<b>weight</b>	<b>cumWeight</b>
TIM1+G	7406.8346	126	15684.9253	0.0000	0.3189	0.3189
TIM2+G	7407.4774	126	15686.2108	1.2855	0.1677	0.4866
TPM1uf+G	7411.0716	125	15686.4846	1.5593	0.1462	0.6329
<b><i>TrN+G (*)</i></b>	<b><i>7411.3088</i></b>	<b><i>125</i></b>	<b><i>15686.9590</i></b>	<b><i>2.0337</i></b>	<b><i>0.1154</i></b>	<b><i>0.7482</i></b>
GTR+G	7401.6495	128	15688.3846	3.4592	0.0566	0.8048
HKY+G	7415.4936	124	15688.4139	3.4885	0.0557	0.8605
TPM2uf+G	7412.1504	125	15688.6422	3.7169	0.0497	0.9103
TIM3+G	7409.0988	126	15689.4536	4.5283	0.0331	0.9434
TPM3uf+G	7413.4525	125	15691.2463	6.3210	0.0135	0.9569
TVM+G	7406.5710	127	15691.3128	6.3875	0.0131	0.9700

(\*) TrN+G, Tamura y Nei (1993)

**Anexo 5.** Resultados de la prueba de Modeltest aplicados a las secuencias nucleotídicas de la CP de aislamientos de SPVG. Para la selección del mejor modelo de substitucion, se utilizó el criterio bayessiano (BIC) y se siguió una topología de NJ. El modelo utilizado debido a su disponibilidad se encuentra en cursiva.

**Settings:**

Phyml version = 2.4.4

Candidate models = 88

Base tree for likelihood calculations = BIONJ tree

sample size = 989 nt

number of sequences = 7

**Model selected:**

Model = TPM2uf+G

gamma shape = 0.4790

CRITERIO DE INFORMACION BAYESIANO (BIC)

SELECCION DE MODELO:

<b>Model</b>	<b>-lnL</b>	<b>K</b>	<b>BIC</b>	<b>delta</b>	<b>weight</b>	<b>cumWeight</b>
TPM2uf+G	3309.3350	18	6742.8105	0.0000	0.6100	0.6100
TIM2+G	3306.8795	19	6744.7962	1.9857	0.2260	0.8360
<b><i>HKY+G(*)</i></b>	<b><i>3314.5615</i></b>	<b><i>17</i></b>	<b><i>6746.3669</i></b>	<b><i>3.5563</i></b>	<b><i>0.1031</i></b>	<b><i>0.9390</i></b>
TrN+G	3312.6827	18	6749.5059	6.6954	0.0214	0.9605
TPM2uf+I+G	3309.3432	19	6749.7235	6.9130	0.0192	0.9797
TIM2+I+G	3306.8876	20	6751.7091	8.8986	0.0071	0.9868
TPM1uf+G	3314.5148	18	6753.1702	10.3596	0.0034	0.9903
TPM3uf+G	3314.5615	18	6753.2635	10.4529	0.0033	0.9935
HKY+I+G	3314.5697	18	6753.2800	10.4694	0.0033	0.9968
TIM1+G	3312.6373	19	6756.3118	13.5012	0.0007	0.9975

(\*) HKY+G, Hasegawa et al, 1985 ó Felsenstein, 1984



**Anexo 6.** Resultados de la prueba de Modeltest aplicados a las secuencias nucleotídicas de la CP de aislamientos de SPV2. Para la selección del mejor modelo de substitucion, se utilizó el criterio bayessiano (BIC) y se siguió una topología de NJ. El modelo utilizado debido a su disponibilidad se encuentra en cursiva.

**Settings:**

Phyml version = 2.4.4

Candidate models = 88

Base tree for likelihood calculations = BIONJ tree

sample size = 1071 nt

number of sequences = 9

**Model selected:**

Model = TPM2uf+G

gamma shape = 0.3740

CRITERIO DE INFORMACION BAYESIANO (BIC)

SELECCION DE MODELO:

<b>Model</b>	<b>-lnL</b>	<b>K</b>	<b>BIC</b>	<b>delta</b>	<b>weight</b>	<b>cumWeight</b>
TPM2uf+G	3816.5082	22	7786.4962	0.0000	0.7278	0.7278
<b><i>HKY+G(*)</i></b>	<b><i>3821.3372</i></b>	<b><i>21</i></b>	<b><i>7789.1776</i></b>	<b><i>2.6815</i></b>	<b><i>0.1904</i></b>	<b><i>0.9183</i></b>
TIM2+G	3816.1692	23	7792.7943	6.2981	0.0312	0.9495
TPM2uf+I+G	3816.5191	23	7793.4942	6.9980	0.0220	0.9715
TrN+G	3821.0577	22	7795.5951	9.0990	0.0077	0.9792
TPM3uf+G	3821.2817	22	7796.0431	9.5469	0.0062	0.9854
TPM1uf+G	3821.2949	22	7796.0694	9.5733	0.0061	0.9914
HKY+I+G	3821.3481	22	7796.1758	9.6797	0.0058	0.9972
TIM2+I+G	3816.1800	24	7799.7924	13.2962	0.0009	0.9981
TVM+G	3816.4577	24	7800.3477	13.8516	0.0007	0.9988

(\*) HKY+G, Hasegawa *et al.*, 1985; ó Felsenstein, 1984

**Anexo 7.** Resultados de la prueba de Modeltest aplicados a las secuencias nucleotídicas de la CP de aislamientos de potyvirus. Para la selección del mejor modelo de substitucion, se utilizó el criterio bayessiano (BIC) y se siguió una topología de NJ. El modelo utilizado debido a su disponibilidad se encuentra en cursiva.

**Settings:**

Phyml version = 2.4.4

Candidate models = 88

Base tree for likelihood calculations = BIONJ tree

sample size = 1189 nt

number of sequences = 80

**Model selected:**

Model = GTR+I+G

gamma shape = 0.5580

CRITERIO DE INFORMACION BAYESIANO (BIC)

SELECCION DE MODELO:

<b>Model</b>	<b>-lnL</b>	<b>K</b>	<b>BIC</b>	<b>delta</b>	<b>weight</b>	<b>cumWeight</b>
GTR+I+G	43558.0901	167	88298.6851	0.0000	1.0000	1.0000
TVM+I+G	43578.3776	166	88332.1793	33.4943	5.33e-008	1.0000
<b><i>GTR+G (*)</i></b>	<b><i>43581.4428</i></b>	<b><i>166</i></b>	<b><i>88338.3096</i></b>	<b><i>39.6246</i></b>	<b><i>2.49e-009</i></b>	<b><i>1.0000</i></b>
TVM+G	43604.6781	165	88377.6994	79.0143	6.95e-018	1.0000
TIM2+I+G	43607.9514	165	88384.2459	85.5608	2.63e-019	1.0000
TIM3+I+G	43614.1625	165	88396.6682	97.9831	5.29e-022	1.0000
TPM3uf+I+G	43627.1271	164	88415.5166	116.8316	4.27e-026	1.0000
TIM3+G	43642.5221	164	88446.3065	147.6215	8.80e-033	1.0000
TPM2uf+I+G	43650.3403	164	88461.9430	163.2579	3.54e-036	1.0000
TPM3uf+G	43657.1789	163	88468.5393	169.8542	1.31e-037	1.0000

(\*) GTR+G, General Time-Reversible ó REV (Tavaré, 1986)

**Anexo 8.** Denominación de la especie viral, aislamiento y el respectivo número de acceso al Genbank de las secuencias nucleotídicas de la proteína de cubierta de 51 potyvirus adicionales incluidos en el análisis filogenético de los potyvirus que infectan al camote con otros miembros de este género.

Virus	Aislamiento	Número de acceso
<i>Sweet potato feathery mottle virus</i>	SPV-Zim	AF016366
	Ch	X84011
<i>Sweet potato latent virus</i> (SPLV)	Jap	E15420
	Tai	X84012
	Ark15	Ref 3
<i>Sweet potato virus G</i> (SPVG)	CH2	X76944
	CH	Z83314
	Eg	AJ515380
	Henan	DQ399861
	Aus54	AM050884
	MD2	AY459606
<i>Sweet potato virus 2</i> (SPV2)	PD12	AY459607
	TOMAS16A	AY459608
	VTSBT-Tschilombo	AY459609
	XN3	AY459611
	Zambia	AY459610
<i>Sweet potato mild speckling</i>		U61228
<i>Agropyron mosaic virus</i>		NC_005903
<i>Bean common mosaic virus</i>		NC_003397
<i>Bean common mosaic necrosis</i>		NC_004047
<i>Bbean yellow mosaic virus</i>		NC_003492
<i>Beet mosaic virus</i>		NC_005304
<i>Chilli veinal mottle virus</i>		NC_005778
<i>Cocksfoot streak virus</i>		NC_003742
<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i>		NC_004013
<i>Daphne virus Y</i>		NC_008028
<i>East Asian passiflora virus</i>		NC_007728
<i>Hordeum mosaic virus</i>		NC_005904
<i>Japanese yam mosaic virus</i>		AB027007
<i>Johnsongrass mosaic virus</i>		NC_003606
<i>Konjac mosaic virus</i>		NC_007913
<i>Lek yellow stripe virus</i>		NC_004011

Cont...

---

<i>Lettuce mosaic virus</i>	NC_003605
<i>Lily mottle virus</i>	NC_005288
<i>Maize dwarf mosaic virus</i>	NC_003377
<i>Narcissus degeneration virus</i>	NC_008824
<i>Onion yellow dwarf virus</i>	NC_005029
<i>Papaya leaf-distortion mosaic</i>	NC_005028
<i>Papaya ringspot virus</i>	NC_001785
<i>Pea seed-borne mosaic virus</i>	NC_001671
<i>Peanut mottle virus</i>	NC_002600
<i>Pennisetum mosaic virus</i>	NC_007147
<i>Pepper mottle virus</i>	NC_001517
<i>Pepper severe mosaic virus</i>	NC_008393
<i>Peru tomato mosaic virus</i>	NC_004573
<i>Plum pox virus</i>	NC_001445
<i>Potato virus A</i>	NC004039
<i>Potato virus V</i>	NC_004010
<i>Potato virus Y</i>	NC_001616
<i>Scallion mosaic virus</i>	NC_003399
<i>Shallot yellow stripe virus</i>	NC_007433
<i>Sorghum mosaic virus</i>	NC_004035
<i>Soybean mosaic virus</i>	NC_002634
<i>Sugarcane mosaic virus</i>	NC_003398
<i>Thunberg fritillary virus</i>	NC_007180
<i>Tobacco etch virus</i>	NC_001555
<i>Tobacco vein mottling virus</i>	NC_001768
<i>Turnip mosaic virus</i>	NC_002509
<i>Watermelon mosaic virus</i>	NC_006262
<i>Wild potato mosaic virus</i>	NC_004426
<i>Wisteria vein mosaic virus</i>	NC_007216
<i>Yam mosaic virus</i>	NC_004752
<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	NC_003224

---